

Aus dem Institut für Medizinische Virologie
Sektion Experimentelle Virologie
des Universitätsklinikums Tübingen

Eingereicht über das Institut für Virologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Aufklärung der Rolle viraler Proteine für die
Entstehung und Progression papillomvirusinduzierter
Tumoren im Kaninchenmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
SONJA JECKEL

Gießen 2003

Aus dem Institut für Medizinische Virologie
Sektion Experimentelle Virologie
des Universitätsklinikums Tübingen
Betreuer: Prof. Dr. T. Iftner

Eingereicht über das Institut für Virologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. H.-J. Thiel

**Aufklärung der Rolle viraler Proteine für die
Entstehung und Progression papillomvirusinduzierter
Tumoren im Kaninchenmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
SONJA JECKEL
Tierärztin aus Wattenscheid

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Iftner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-J. Thiel

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2003

1	EINLEITUNG	8
1.1	Einteilung und Aufbau von Papillomviren	8
1.2	Papillomvirusinduzierte Krankheiten	10
1.3	CRPV-Tiermodell	12
1.4	Fragestellungen im Rahmen dieser Promotionsarbeit.....	14
1.4.1	Charakterisierung spezifischer Funktionen von CRPV-E2 und eines verkürzten alternativ gespleißten CRPV-E2 Proteins <i>in</i> <i>vitro</i> und Untersuchung der jeweiligen Bedeutung <i>in vivo</i>	14
1.4.2	Therapieansatz mit Polyphenolen aus grünem Tee.....	18
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Material	21
2.1.1	Tiere	21
2.1.2	Eukaryonte Zellen	21
2.1.3	Bakterien:.....	21
2.1.4	Nukleinsäuren.....	21
2.1.4.1	synthetisch hergestellte Oligonukleotide:	21
2.1.4.2	Plasmide	23
2.1.4.3	Rekombinante Plasmide	23
2.1.4.4	Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide.....	25
2.1.5	Größenmarker	25
2.1.6	Enzyme	26
2.1.6.1	Restriktionsendonukleasen.....	26
2.1.6.2	Sonstige Enzyme	26
2.1.7	Reagenzien.....	26
2.1.8	Medien.....	27
2.1.8.1	Medien für die Zellkultur	27
2.1.8.2	Medien für die Bakterienkultur	27

2.1.9	Antiseren und Antikörper:.....	28
2.1.10	Polyphenon TM E Formulierungen:.....	28
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Bakterienkultur.....	29
2.2.1.1	Kulturen für Plasmidisolierung.....	29
2.2.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien.....	29
2.2.1.3	Transformation von Bakterien.....	30
2.2.2	Zellkultur.....	30
2.2.2.1	Kultivierung eukaryonter Zellen.....	30
2.2.2.2	Einfrieren von Zellen.....	31
2.2.2.3	Mitomycin C-Behandlung von 3T3 J2-Zellen.....	31
2.2.2.4	Transfektion eukaryonter Zellen.....	31
2.2.3	Tiermodell.....	32
2.2.3.1	Narkose und Infektionsvorbereitung.....	32
2.2.3.2	Infektion mit CRPV-Viruspartikeln.....	32
2.2.3.3	Injektion mit CRPV-DNA.....	33
2.2.3.4	Behandlung der Tumoren mit Polyphenon TM E.....	33
2.2.3.5	Größenbestimmung der Tumoren.....	33
2.2.3.6	Entnahme von Tumoren.....	34
2.2.3.7	Euthanasie.....	34
2.2.4	DNA –Methoden.....	34
2.2.4.1	Standardmethoden.....	34
2.2.4.2	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	35
2.2.4.3	Fragmentelution aus Agarosegelen.....	35
2.2.4.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35
2.2.4.5	<i>In vitro</i> Mutagenese mit Hilfe der PCR.....	36
2.2.4.6	Quantitative Echt-Zeit PCR.....	37
2.2.4.7	DNA-Sequenzierung.....	38
2.2.4.8	Hybridisierung von einzelsträngigen Oligonukleotiden.....	39
2.2.4.9	Extraktion extrachromosomaler DNA aus eukaryonten Zellen.....	39
2.2.4.10	Extraktion gesamtzellulärer DNA aus Gewebe.....	39

2.2.4.11	Präzipitation von CRPV-DNA an Gold-Partikel als Mikro- transportsystem für die Injektion in Kaninchenhaut	40
2.2.4.12	Radioaktive Markierung von DNA	40
2.2.4.12.1	5' Endmarkierung	40
2.2.4.12.2	Durchgehende Markierung	41
2.2.4.13	DNA-Blot-Hybridisierungen nach Southern	41
2.2.5	RNA-Methoden	42
2.2.5.1	RNA-Isolation aus Gewebe	42
2.2.5.2	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (1-Schritt-RT- PCR)	42
2.2.5.3	2-Schritt-RT-PCR	43
2.2.5.4	PolyA ⁺ mRNA-Isolation aus gesamtzellulärer RNA	43
2.2.5.5	Northern-Blot-Hybridisierung	43
2.2.6	Protein-Methoden	44
2.2.6.1	Standardmethoden	44
2.2.6.2	Nukleäre Extrakte aus Säugerzellen	44
2.2.6.3	Western-Blot-Analyse	44
2.2.6.4	Luziferase- Expressionsanalyse	45
2.2.7	DNA-Protein-Interaktion	46
2.2.7.1	Gelretardationsanalyse	46
3	ERGEBNISSE	47
3.1	Gezielte Mutagenesen in CRPV-E2 und Charakterisierung der Mutanten <i>in vitro</i>	47
3.1.1	Einführung gezielter Mutationen in CRPV-E2	47
3.1.2	Stabile Expression der mutierten CRPV E2-Proteine	48
3.1.3	DNA-Bindungsfähigkeit der mutierten E2-Proteine	49
3.1.4	Auswirkung der Mutationen in CRPV-E2 auf die Transaktivierungs-aktivität	49
3.1.5	Replikationseffizienz der CRPV-E2 Mutanten	51

3.2	Identifizierung eines unbekanntes Transkripts in CRPV-induzierten Tumoren und Charakterisierung seiner Funktionen <i>in vitro</i>.....	52
3.2.1	Identifizierung eines neuen Transkripts in CRPV	53
3.2.2	Wirkung von CRPV-E9 ^{E2C} auf verschiedene Promotorkonstrukte.....	53
3.2.3	Bedeutung des E9-Teils von E9 ^{E2C} bei der Repression eines Promotorkonstrukts	55
3.2.4	Wirkung von CRPV-E9 ^{E2C} auf die Transaktivierungsaktivität von E2	56
3.2.5	Wirkung von E9 ^{E2C} auf die E1- und E2-abhängige Replikation des CRPV-Replikationsursprungs.....	57
3.3	Überprüfung der Bedeutung der <i>in vitro</i> Daten im Tiermodell	59
3.3.1	Einfluß der Transaktivierungsfunktion von CRPV-E2 auf die Tumorinduktion <i>in vivo</i>	59
3.3.1.1	Einführung von Mutationen in E2 im gesamtgenomischen Kontext von CRPV.....	59
3.3.1.2	Tumorinduktion in Kaninchen durch die mutierten CRPV-Genome	60
3.3.2	Bedeutung von CRPV-E9 ^{E2C} <i>in vivo</i>	62
3.3.2.1	Einführung von Mutationen in E9 im gesamtgenomischen Kontext von CRPV.....	62
3.3.2.2	Tumorinduktion in Kaninchen durch die gesamtgenomischen E9-Mutanten	63
3.3.2.3	Kopienzahl und physikalischer Status der DNA in CRPV-induzierten Tumoren	65
3.3.2.4	Präsenz des Spleißtranskripts und Transkriptmengenvergleich in RNA aus CRPV-induzierten Tumoren	66
3.4	Behandlung von CRPV-induzierten Papillomen mit PolyphenonTM E aus Extrakt von grünem Tee.....	68
3.4.1	Infektion der Kaninchen mit CRPV und Behandlungsschema	68

3.4.2	Behandlungserfolg durch Polyphenon™ E	70
4	DISKUSSION	75
4.1	Rolle der Transaktivierungsdomäne von CRPV-E2 und des Repressorproteins E9^E2C im viralen Replikationszyklus	75
4.2	Wirksamkeit von Polyphenon™ E gegen CRPV-induzierte Hauttumoren	81
5	ZUSAMMENFASSUNG	84
6	SUMMARY	86
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	88
8	DANKSAGUNG	99

Abkürzungen

λ	Wellenlänge in nm
γ - ³² P-ATP	mit ³² P an der γ -Position markiertes ATP
μ	mikro
A	Alanin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPV	bovines Papillomvirus
cDNA	komplementäre DNA zur mRNA
Ci	Curie
COPV	canines orales Papillomvirus
cpm	counts per minute ; radioaktiver Zerfall
CRPV	cottontail rabbit Papillomvirus
C-Terminus	Carboxyterminus
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamin
E1-E9	frühe Leserahmen der Papillomviren („early“)
E2C	Carboxyterminus von E2
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetsäure
EV	Epidermodysplasia verruciformis
g	Normalfallbeschleunigung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPV	humanes Papillomvirus
I	Isoleucin
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
K	Lysin
kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
L	Leucin
L1 + L2	späte Leserahmen der Papillomviren („late“)
LE6	L(ong) E6, vollständiges E6-Protein
M	molar
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
n	nano

Abkürzungen

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCR	nicht-kodierende Region (non-coding region)
NMSC	nicht-melanozytäres Hautkarzinom ("non-melanocyte squamous-cell carcinoma")
nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
p	pico
P1-P3, PL	Promotor 1-3, später ("late") Promotor
p97	Promotor an Nukleinsäureposition 97 von HPV 16, 31
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNK	Polynukleotidkinase
pRB	Retinoblastomprotein
Q	Glutaminsäure
R	Arginin
rATP	ribosomales Adenosintriphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SE6	S(hort) E6, verkürztes E6-Protein
SSC	0,15 M Natriumchlorid, 0,015 M Natriumcitrat
SSPE	0,18 M Natriumchlorid, 10mM Natrium-dihydrogenphosphat, 1 mM EDTA
T	Thymin
T4, T7	Bakteriophage
Tab.	Tabelle
TBE	Tris Borat EDTA Puffer
TBS	trisgepufferte Salzlösung
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	enzymatische Einheit ("units")
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-inodyl- β -D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Einteilung und Aufbau von Papillomviren

Papillomviren gehören zur Familie der Papillomaviridae (NCBI Datenbank, Taxonomie). Basierend auf mindestens 10% Unterschieden in der Nukleinsäuresequenz von drei definierten Genomabschnitten konnten bisher 91 verschiedene Typen Humaner Papillomviren (HPV) identifiziert werden (NCBI Datenbank).

Papillomviruspartikel haben ein ikosaedrisches Kapsid, das aus 72 Kapsomeren aufgebaut ist; eine Lipidhülle fehlt. Die Partikel haben einen Durchmesser von etwa 55 nm. Die Größe des zirkulär geschlossenen doppelsträngigen DNA Genoms beträgt etwa 8 kbp (Howley, 1996). Charakteristisch für alle Papillomviren ist die Anordnung der zum Teil überlappenden offenen Leserahmen auf nur einem DNA-Strang. Die relative Lage der einzelnen Leserahmen zueinander ist sowohl bei humanen als auch bei animalen Papillomvirus-Typen konserviert. Eine Genomstruktur von Papillomviren ist exemplarisch anhand des CRPV-Genoms (cottontail rabbit papillomavirus) in Abb.1 gezeigt. Das Genom wird in eine kodierende und eine nicht-kodierende Region (NCR (non-coding-region)) unterteilt. Der kodierende Bereich beinhaltet die Leserahmen der frühen Gene („early“; E1 bis E8), deren Proteine früh im Vermehrungszyklus gebildet werden und regulatorische Funktionen bei der Transformation der Wirtszelle, der viralen DNA-Replikation und der Transkriptionskontrolle ausüben, sowie die späten Gene („late“; L1 und L2), welche für die beiden spät im viralen Replikationszyklus synthetisierten Strukturproteine kodieren (Howley, 1996). In der bis zu 1 kbp großen NCR, die zwischen den Leserahmen für L1 und E6 liegt, sind cis-aktive regulatorische Sequenzen lokalisiert, die für die Transkription und die Replikation der Papillomviren essentiell sind (Howley, 1996). Wie man durch zahlreiche Studien an Zellkulturen und transgenen Tieren erkennen konnte, spielen die Proteine der frühen Gene E6 und E7 für die Zelltransformation und die papillomvirusinduzierte

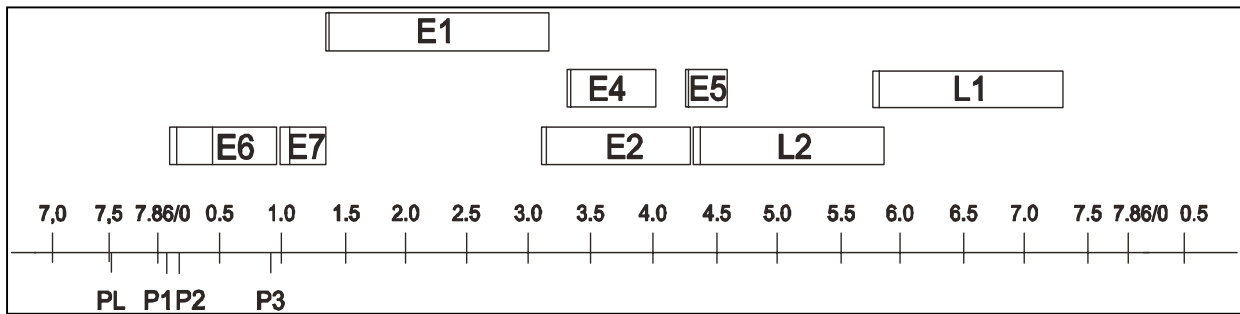


Abb. 1: Genomstruktur des Cottontail Rabbit Papillomavirus

Die Graphik des linearisierten CRPV-Genoms zeigt die Lage der offenen Leserahmen (ORF; Rechtecke) der frühen („early“, E) und der späten („late“, L) Gene sowie die Anordnung der Promotoren für die frühen Gene (P1-3) und des Promotors PL für die späten Gene. Die vertikalen Linien innerhalb der ORFs repräsentieren die Lage der Startcodons der Translation. Die Größe des Genoms beträgt 7868 bp. Die nicht-kodierende Region (NCR) liegt zwischen L1 und E6.

Karzinomentstehung eine sehr wichtige Rolle (Laimins,1996). Erste Hinweise für die Bedeutung dieser Genprodukte ergaben

sich aus dem Nachweis einer kontinuierlichen Expression der Genregion E6/E7 in allen HPV-positiven Zervixkarzinomen sowie in davon abgeleiteten Zelllinien (zur Hausen, 1994). Es besteht eine Korrelation zwischen dem onkogenen Potential der E6- und E7-Proteine verschiedener genitaler Papillomviren und deren Fähigkeit an die Tumorsuppressorproteine p53 bzw. pRB zu binden. Ein solcher Zusammenhang konnte jedoch bei kutanen Papillomviren noch nicht festgestellt werden (Elbel et al., 1997; Schmitt et al., 1994; Huibregtse und Scheffner, 1994; Vousden, 1995). Bei CRPV konnten zwei E6 Proteine identifiziert werden. Das sogenannte lange E6 (LE6) und das um 100 Aminosäuren kürzere short E6 (SE6), die sich in zellulärer Lokalisation und Phosphorylierungsmuster unterscheiden (Barbosa und Wettstein, 1988). Der zentrale Regulator der viralen E6 und E7 Transkription ist das E2-Protein. E2 hat transaktivierende und transreprimierende Wirkung auf verschiedene virale Promotoren. Zudem unterstützt E2 die virale Replikation, indem es die Bindung des Replikationsproteins E1 an den Replikationsorigin in der NCR stabilisiert (McBride et al., 1991). E5 von BPV1 (bovines Papillomvirus) werden transformierende Eigenschaften zugeschrieben (Campo, 1997), E4 von CRPV ist essentiell für die Kapsidsynthese und die späte virale Amplifikation des CRPV-Genoms (Peh, 2001).

1.2 Papillomvirusinduzierte Krankheiten

Aus veterinärmedizinischer Sicht spielen insbesondere die Rinderpapillomviren (bovine papillomavirus = BPV 1-6) und das Hundepapillomvirus (canine oral papillomavirus = COPV) als Krankheitserreger eine Rolle. Bei Rindern entstehen durch verschiedene BPV-Typen Papillome und Fibropapillome besonders der Haut, an Zitzen und Penis, im Verdauungstrakt und in der Harnblase. Die meisten dieser Papillome regredieren ohne klinische Auswirkungen innerhalb eines Jahres (Campo, 1997). Allerdings spielen insbesondere bei Zitzen- und Penispapillomen wirtschaftliche Verluste durch Behinderung beim Melken und beim Deckakt eine Rolle. Zu einer malignen Entartung der Papillome bei Rindern kommt es gelegentlich besonders in der Harnblase und im oberen Verdauungstrakt, wobei die Aufnahme von Adlerfarn mit der Nahrung als Kokarzinogen diskutiert wird (Campo, 1997). BPV 1 kann auch in Sarkoiden bei Pferden regelmäßig nachgewiesen werden. Diese Tumoren, zu deren bevorzugten Lokalisationen Auge und mechanisch beanspruchte Stellen, wie Schenkelinnenfläche, Beine und Gurtlage gehören, wachsen infiltrativ, metastasieren aber nicht. Nach chirurgischer Exstirpation kommt es häufig zur Rezidivbildung. Bei dieser wirtsfremden Infektion mit BPV 1 beim Pferd handelt es sich um eine abortive Infektion, denn in den Sarkoiden werden keine vollständigen Viruspartikel gebildet (Teifke, 1994; Goodrich et al., 1998). Das canine orale Papillomvirus (COPV) verursacht insbesondere bei jungen Hunden die Bildung von Papillomen in der Mundschleimhaut, die aber meist spontan nach 4-8 Wochen regredieren (Nicholls und Stanley, 1999). Auch bei vielen weiteren Tierarten wurden papillomatöse Erkrankungen beschrieben, die durch speziesspezifische Papillomviren ausgelöst wurden.

Die humanen Papillomviren werden wegen ihres Gewebetropismus einerseits für den Bereich der verhornenden Haut und andererseits für die Schleimhaut des Anogenitalbereichs in „kutane“ (z.B. HPV 1, 2, 5 und 8) und „genitale“ (z.B. HPV 6, 11, 16 und 18) Papillomviren unterteilt. Vertreter der genitalen HPV-Typen sind ätiologisch an der Entstehung von Karzinomen im Anogenitaltrakt des Menschen beteiligt (Bosch et al., 2002; zur Hausen, 1991). Jährlich erkranken

weltweit 400000 Frauen an Gebärmutterhalskrebs. In den Entwicklungsländern ist diese Krebsart eine häufige Todesursache. 1990 traten in der EU 24 600 neue Zervixkarzinome und 12900 durch das Zervixkarzinom bedingte Todesfälle auf. In 97,7% aller untersuchten Zervixkarzinome konnte HPV-DNA nachgewiesen werden (Bosch et al., 2002), wobei die Typen 16 und 18 mit 67-72% die höchste Prävalenz zeigten. Im Gegensatz dazu wurden die Typen 6 und 11 fast ausschließlich in gutartigen Läsionen wie Condylomata acuminata oder niedriggradigen Dysplasien gefunden (Walboomers et al., 1994). Wegen dieses unterschiedlichen karzinogenen Potentials bestimmter humaner Papillomvirustypen erfolgte eine Einteilung in eine Gruppe mit hohem karzinogenen Potential („high risk“-HPV, z.B. HPV 16, 18, 31) und eine mit niedrigem („low risk“-HPV, z.B. HPV 1, 2, 6, 11) (Stubenrauch und Iftner, 1999; zur Hausen, 1991).

Einige „low risk“ Vertreter kutaner humaner Papillomviren (HPV 1 oder 2) verursachen plantare oder vulgäre Warzen an Fußsohlen und Händen besonders bei Kindern und Jugendlichen. Diese gutartigen Tumoren zeigen eine Tendenz zur spontanen Rückbildung (Stanley, 1994; Stubenrauch und Iftner, 1999). Andere kutane HPV-Typen werden mit der Entwicklung des nicht-melanozytären Hautkarzinoms (NMSC) in Verbindung gebracht, da in diesen Hautkarzinomen und deren Vorstufen HPV-DNA verstärkt nachgewiesen werden kann (Frost and Green, 1994; Harwood et al., 2000; Iftner et al., eingereicht; Leigh and Glover, 1995; Proby et al., 1996). Das NMSC zählt zu den häufigsten Krebsarten des kaukasischen Bevölkerungstyps. 1997 traten in den USA 800000 Neuerkrankungen auf und 2000 Todesfälle. Alle präkanzerösen Läsionen müssen behandelt werden, und deshalb stellt NMSC einen hohen Kostenfaktor für die Gesundheitssysteme dar. Bei Patienten, die aufgrund einer Organtransplantation lange immunsupprimiert werden, tritt NMSC besonders häufig als schwerwiegende Komplikation auf, da hier das Risiko, kutane Plattenepithelkarzinome zu entwickeln, 50fach höher ist als in der immunkompetenten Bevölkerung (Harwood et al., 2000, Leigh and Glover, 1995). In bis zu 84% der malignen Hauttumoren der immunsupprimierten Patienten konnte HPV-DNA nachgewiesen werden (Berkhout et al., 1995;

Harwood et al., 2000; Shamanin et al., 1994). Aktuelle Studien zeigten jedoch, daß auch bei immunkompetenten Personen mehr als 50% der Plattenepithelkarzinome HPV-DNA enthielten (Iftner et al., eingereicht; Shamanin et al., 1995). Die Bedeutung bestimmter HPV-Typen bei der Entstehung von Hautkarzinomen bei Patienten mit der seltenen, vererbaren Hautkrankheit Epidermadysplasia verruciformis (EV) hatte man schon früh erkannt (Orth, 1987). Patienten, die an dieser Krankheit leiden, entwickeln in jungen Jahren flache Warzen und makulöse Veränderungen an den Extremitäten und im Gesicht, die lebenslang persistieren und im Verlauf der Erkrankung fast den gesamten Körper bedecken können (Lutzner, 1978). In den benignen Läsionen lassen sich bis zu 18 verschiedene EV-spezifische Papillomvirus-Typen nachweisen. 30-60% der EV-Patienten entwickeln nach einem längeren Krankheitsverlauf Plattenepithelkarzinome der Haut (Jablonska und Orth, 1985). Diese entstehen fast ausschließlich an sonnenexponierten Stellen des Körpers, daher ist eine kokarzinogene Wirkung des UV-Anteils im Sonnenlicht sehr wahrscheinlich. In über 90% dieser malignen Tumoren kann man DNA der HPV-Typen 5 oder, seltener, 8 nachweisen (Orth, 1987; Pfister, 1992).

1.3 CRPV-Tiermodell

Die molekularen Vorgänge, die bei Papillomentstehung, maligner Progression und Regression papillomvirusinduzierter Hauttumoren stattfinden, sind weitgehend unbekannt und in Zellkulturexperimenten nicht zu klären. Die Etablierung eines geeigneten Tiermodells für humane Papillomviren wird durch die hohe Spezifität von Papillomviren verhindert. Deshalb basiert das derzeit einzige Tiermodell für papillomvirusinduzierte Hauttumoren auf der Infektion von Hauskaninchen mit CRPV (cottontail rabbit papillomavirus). CRPV ist schon 1932 von R. Shope als erstes DNA-Tumorvirus identifiziert worden. Der natürliche Wirt von CRPV ist das cottontail rabbit (*Sylvilagus floridanus*, Baumwollschwanzkaninchen) (Shope und Hurst, 1933). Eine Laborinfektion mit CRPV führt in der Kaninchenhaut zunächst innerhalb von 3 bis 6 Wochen sowohl

beim cottontail rabbit als auch beim Hauskaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) mit hoher Effizienz zur lokalen Ausbildung gutartiger epithelialer Tumoren (Papillomen). Beim cottontail rabbit regrediert ein Großteil dieser Papillome spontan, nur bis zu 23% der Papillome progredieren zu Karzinomen. Beim Hauskaninchen hingegen persistieren in der Regel die Papillome lebenslang und über 80% progredieren schnell ohne Einwirkung von äußeren Kofaktoren innerhalb von 6-14 Monaten zu invasiv wachsenden Karzinomen (Syverton, 1952). Im weiteren Verlauf kann es zur Metastasenbildung besonders in der Lunge und den regionalen Lymphknoten kommen. Im Gegensatz zum cottontail rabbit verläuft beim Hauskaninchen die Infektion mit CRPV abortiv, denn es werden keine vollständigen Viruspartikel gebildet und die Expression der Kapsidproteine L1 und L2 ist nur gering. In den Papillomen von cottontail rabbits hingegen findet eine starke Viruspartikelproduktion statt, in ihren Karzinomen wiederum nicht (Wettstein, 1987). Ein Zusammenhang zwischen abortiver, wirtsfremder Infektion und erhöhter Karzinogenese ist höchstwahrscheinlich. Aufgrund der hohen Progressionsrate stellt das Hauskaninchen ein geeignetes *in-vivo*-Modellsystem insbesondere für den papillomvirusassoziierten Hautkrebs dar. An diesem Tiermodell konnten zum Beispiel erstmalig die primären Zielzellen von CRPV identifiziert werden, welche die epithelialen Stammzellen in Haarfollikeln sind (Schmitt et al., 1996). Ebenso konnte HPV-DNA verstärkt in Haarfollikeln immunsupprimierter Transplantatempfänger nachgewiesen werden (Boxman et al., 1997). Im Kaninchen können Tumoren nicht nur durch komplette CRPV-Viruspartikel, sondern auch durch unverpackte virale DNA induziert werden. Dadurch wird die Verwendung rekombinanter CRPV-DNA zur Untersuchung der *in-vivo*-Bedeutung einzelner Genomabschnitte ermöglicht. So konnte mit Hilfe von Deletions- oder Insertionsmutanten gezeigt werden, dass fast jeder offene Leserahmen innerhalb des CRPV-Genoms, abgesehen von dem für E5 und L2, für die Tumorentstehung im Kaninchen essentiell ist (Brandsma et al., 1991; 1992; Meyers et al., 1992; Nasserri et al. 1989; Wu et al. 1994). In Zellkulturversuchen hingegen reichte die Expression von CRPV-LE6 und -E7 aus, um NIH3T3 Zellen in Softagar wachsen zu lassen und um mit diesen Zelllinien Tumoren in Nacktmäusen zu induzieren (Meyers et al., 1992).

Mein Augenmerk richtete sich besonders auf das frühe virale E2 Protein, den Regulator der viralen Genexpression.

1.4 Fragestellungen im Rahmen dieser Promotionsarbeit

1.4.1 Charakterisierung spezifischer Funktionen von CRPV-E2 und eines verkürzten alternativ gespleißten CRPV-E2 Proteins *in vitro* und Untersuchung der jeweiligen Bedeutung *in vivo*

Das multifunktionelle frühe E2 Protein der Papillomviren ist der zentrale Regulator der frühen Genexpression und der viralen DNA Replikation. E2 bildet Dimere, die spezifisch an die palindromische DNA Sequenz ACCN₆GGT binden (McBride et al., 1991). Diese Sequenz befindet sich achtmal in der NCR von CRPV in der Nähe des späten Promotors (PL) und der frühen Promotoren vor LE6 (P1) und vor SE6 (P2) (Salmon et al., 2000). Eine weitere E2-Bindestelle befindet sich kurz vor dem E7 Promotor (P3) und eine in E1 ohne bekannten Bezug zu einem Promotor (Abb.2). Für die DNA-Bindungsfähigkeit ebenso wie für die Dimerisierung von E2 ist der C-Terminus des E2-Proteins zuständig. Der N-Terminus ist für die Transaktivierungs- und Replikationsfunktion von E2

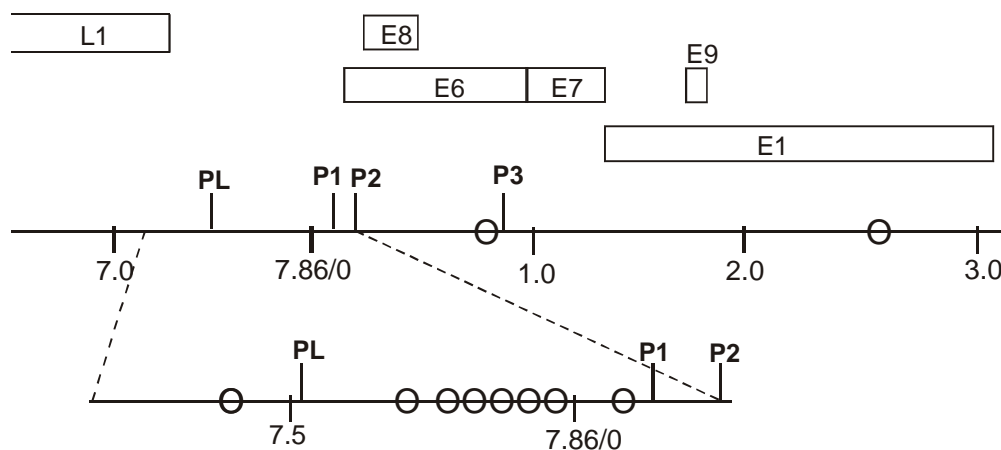


Abb. 2: E2-Bindestellen im CRPV-Genom

Die Graphik zeigt einen Ausschnitt des linearisierten CRPV-Genoms. Die Rechtecke symbolisieren die offenen Leseraster, die Position der frühen Promotoren P 1-3 und des späten Promotors PL sind eingezeichnet. Die Kreise spiegeln die E2-Bindestellen mit der DNA-Sequenz ACCN₆GGT wider.

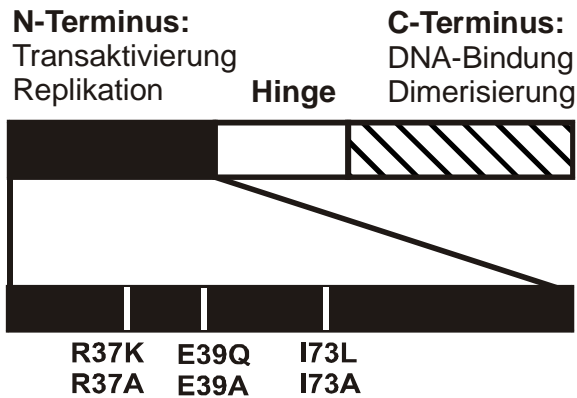


Abb. 3: Aufbau des E2-Proteins von CRPV
Die Graphik zeigt das E2-Protein, das in drei Regionen unterteilt wird. Die in den N-Terminus eingeführten Mutationen hoch konservierter Aminosäuren sind durch weiße Linien gekennzeichnet.

verantwortlich. Als Verbindungsglied zwischen C- und N-Terminus dient die enthaltene, stimulierte (Hawley-Nelson et al., 1988; Stubenrauch et al., 1998). Auch einige frühe BPV 1-Promotoren in ihrem natürlichen Kontext wurden durch E2 von BPV 1 aktiviert (McBride et al., 1991). Im Gegensatz dazu wurde der p97 Promotor vor dem offenen E6 Leserahmen von HPV16 und die entsprechenden hoch konservierten Promotoren von HPV 6, 11, 18, 31 und CRPV durch die Bindung von E2 an die promotorproximalen E2-Bindestellen reprimiert (Bernard et al., 1989; Dong et al., 1994; Fujii et al., 2001; Rapp et al., 1997; Romanczuk et al., 1990; Stubenrauch et al., 2001). Der E7 Promotor von HPV 6a wurde bisher als einziger natürlicher HPV Promotor identifiziert, der durch E2 aktiviert wird (Rapp et al., 1997). Eine weitere Funktion von E2 ist die Stimulierung der viralen DNA-Replikationseffizienz, indem E2 an das E1 Protein bindet und dessen Fähigkeit, den Replikationsursprung zu erkennen, verbessert (Stenlund, 1996). Um die Replikationsfunktion von E2 in BPV 1, HPV 11, 16, 18 und 31 genetisch von der Transaktivierungsfunktion zu trennen, genügte der Austausch der hochkonservierten Aminosäure 37 – (Arginin) - oder der Aminosäure 73 – (Isoleucin) – oder der Aminosäure 39 – (Glutamin). Dabei zog Austausch der Aminosäure 37 oder 73 einen Verlust der Transaktivierungsfunktion bei gleichzeitigem Erhalt der Replikationseffizienz nach sich. Austausch der Aminosäure 39 hatte den umgekehrten Effekt: Verlust der Replikationseffizienz bei erhaltener Transaktivierungsfunktion (Brokaw et al., 1996; Cooper et al., 1998; Harris und Botchan, 1999; Sakei et al., 1996; Stubenrauch et al., 1998). Als weitere Funktion des E2 Proteins wurde für BPV 1 beschrieben, dass E2 bei

der Mitose die Anheftung der episomalen viralen DNA an die Wirtszellchromosomen vermittelt und damit den Verlust der viralen DNA bei der Zellteilung verhindert (Ilves et al., 1999; Lehman und Botchan, 1998; Skiadopoulos und McBride, 1998). Auch wurde bei BPV 1 gezeigt, dass sowohl die Transaktivierungs- als auch die Replikationsfunktion von E2 für die BPV 1-vermittelte Transformation von Zellen nötig sind (Brokaw et al., 1996). Hingegen sind das E2 Gen von HPV 16 und die Transaktivierungsfunktion von E2 im gesamtgenomischen Kontext von HPV 31 für die Immortalisierung primärer Keratinozyten nicht erforderlich (Romanczuk et al., 1992; Stubenrauch et al., 1998). Direkte Rückschlüsse aus diesen *in vitro* Zellkulturdaten auf die Bedeutung der verschiedenen Aktivitäten von E2 bei der Tumorentstehung und –progression *in vivo* sind aber nicht möglich. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden deshalb Funktionen des zentralen Regulators E2 von CRPV genauer charakterisiert, und anschließend die Rolle der Transaktivierungsdomäne von CRPV-E2 bei Tumorentstehung und –progression *in vivo* im Tiermodell Hauskaninchen untersucht.

Neben dem vollständigen E2 Protein wurden zuerst in BPV 1-infizierten Zellen zwei weitere verkürzte regulatorische E2 Proteine identifiziert, E2C und E8/E2 (Choe et al., 1989; Hubbert et al., 1988; Lambert et al., 1987). E2C ist ein N-terminal verkürztes E2-Protein, dessen Promotor innerhalb des E2 Gens liegt. E8/E2 ist ein Fusionsprotein. Es wird kodiert durch Teile des E8-Gens von BPV 1, welches in einem überlappenden Leserahmen zu E1 liegt, und durch ein N-terminal verkürztes E2-Gen, das Hinge und C-Terminus von E2 beinhaltet. E8/E2 und E2C ist der C-Terminus von E2 gemeinsam, mit seiner Fähigkeit zu dimerisieren und DNA zu binden. Diese beiden Proteine sind also in der Lage Homo- und Heterodimere mit dem vollständigen E2-Protein zu bilden, die spezifisch an E2-Bindestellen binden können. Es wurde beschrieben, dass beide verkürzten E2-Proteine die E2-vermittelte Transaktivierung des frühen SV40 Promotors in Reporterassays inhibieren ebenso wie die Transformation von Nagerzellen. Desweiteren reprimieren sie Promotoren in der nicht-kodierenden Region von BPV 1, die durch das vollständige E2-Protein aktiviert werden (Choe et al., 1989; Lambert et al., 1987; Lambert et al., 1990). Gespleißte virale

Transkripte vergleichbar E8/E2 von BPV 1 wurden auch bei HPV 11, 16, 31 und 33 beschrieben. Die entsprechenden Proteine wurden bei HPV 11: E2C, bei HPV 16: sE2, bei HPV 31: E8^ΔE2C und bei HPV 33: E2C genannt (Doorbar et al., 1990; Rotenberg et al., 1989; Snijders et al., 1992; Stubenrauch et al., 2000). Bei allen untersuchten E2C-Fusionsproteinen konnte eine inhibierende Wirkung auf das vollständige E2-Protein sowohl bei der Replikation eines Konstrukts, das den jeweiligen Replikationsursprung enthielt, als auch in Transaktivierungsversuchen nachgewiesen werden. Dieser Effekt kann wahrscheinlich zum Teil auf Konkurrenz mit dem vollständigen E2 um die E2-Bindestellen und auf eine Heterodimerbildung zwischen dem E2C-Fusionsprotein und dem vollständigen E2-Protein zurückgeführt werden kann (Bouvard et al., 1994; Choe et al., 1989; Liu et al., 1995; Stubenrauch et al., 2000). Bei E8^ΔE2C von HPV31 wurde zusätzlich gezeigt, dass es alleine die Basalaktivität des homologen Promotors p97 ebenso wie von heterologen Promotoren und synthetischen Reporterkonstrukten mit anderen viralen Promotoren in Luziferasereporterassays reprimiert. Auch findet beim homologen Promotor p97 eine Repression durch E8^ΔE2C von einer promotordistalen E2 Bindestelle aus statt, von der aus das vollständige E2-Protein aktivierend wirkt (Stubenrauch et al., 2000). Diese Erkenntnisse suggerieren, dass E8^ΔE2C nicht nur ein Antagonist der E2-Aktivität ist, sondern ein Repressor aller viralen Promotoren. Nicht eindeutig sind die bisherigen Kenntnisse über diese Repressorproteine, wenn man die Daten über gesamtgenomische Mutanten der E2C-Fusionsproteine betrachtet. Entsprechend den Erwartungen nach den Zellkulturversuchen mit Expressionsvektoren verursacht ein knock-out der E8^ΔE2C Expression durch Mutation des E8 Startkodons im HPV 31 Gesamtgenom eine vielfach höhere DNA-Replikation als Wildtyp HPV 31 in transienten Replikationsversuchen in primären humanen Keratinozyten. Diese E8 atg-Mutante zeigte sich aber unfähig, HPV 31 Genome stabil episomal in der Zellkultur zu erhalten (Stubenrauch et al., 2000). Mutation des entsprechenden E8/E2 Fusionsproteins im BPV 1 Genom zeigte interessanterweise überhaupt keinen Phänotyp in stabil transfizierten Nagerzellen (Lambert et al., 1990). Die genaue Funktion der E2 Repressoren im viralen Replikationszyklus ist bisher noch unklar. Über ihre Bedeutung bei

Tumorentstehung und –progression gibt es bisher keine Angaben, obwohl die *in vitro* Daten ihnen eine bedeutende Rolle bei der Regulation der viralen DNA Replikation und der Genexpression zusprechen. Deshalb wurde in dieser Arbeit versucht, ein verkürztes, gespleißtes E2 Transkript aus CRPV-induzierten Kaninchentumoren zu isolieren, seine Funktion *in vitro* zu charakterisieren und mit Hilfe von knock-out Mutationen die Bedeutung bei Tumorentstehung, -wachstum und –progression *in vivo* zu untersuchen.

1.4.2 Therapieansatz mit Polyphenolen aus grünem Tee

Bezüglich der Therapie papillomvirusinduzierter Tumoren gibt es verschiedene Ansätze, die sich in die Bereiche chemische Therapie, chirurgische Therapie und Immuntherapie einteilen lassen (Gross und Barrasso, 1997). Zu den chemischen Therapeutika zählen zum einen keratolytische Medikamente wie Salizylsäure, Tretinoin (Retinoinsäure) und Cantharidin, des weiteren antimikrobielle Agentien wie Formalin und Glutaraldehyd, antimitotische bzw. zytotoxische Substanzen, zu denen Podophyllin, Podophyllotoxin, 5-Fluorouracil und Bleomycin gehören, und Kaustika (Ätzmittel) wie Trichloressigsäure und Salpetersäure. Je nach Therapeutikum unterscheidet sich die lokale Anwendbarkeit. Chemische Agentien sind wegen ihrer zum Teil erheblichen Nebenwirkungen wie starken lokalen Hautreaktionen nur bei Hautwarzen und gelegentlich an den externen Genitalien einsetzbar. Nur 5-Fluorouracil ist auch zur Behandlung urethraler, intra-analer und vaginaler Kondylome geeignet. Die Wirksamkeit der verschiedenen Agentien ist eher mäßig, selbst bei zwischenzeitlicher Regression des Tumors sind Rezidive aufgrund der persistierenden Virusinfektion nicht selten. Chirurgische Methoden wie die Exzision mittels Skalpell, Elektrochirurgie oder Laser spielen insbesondere bei neoplastischen Veränderungen und mechanisch obstruktiven Tumoren eine große Rolle. Desweiteren die Kryochirurgie, die aufgrund der geringen Traumatisierung und Demarkierung sehr gerne bei der Behandlung benignen kutaner, genitaler und okularer HPV-induzierter Läsionen eingesetzt wird. Immunologische Therapiekonzepte werden

alleine oder zusammen mit chemischen oder chirurgischen Therapien verwendet. Ziel dieser Therapieform ist es, Rezidivbildungen zu verhindern, indem das ätiologisch verantwortliche Agens, das Papillomvirus, von der körpereigenen Immunabwehr eliminiert wird (Gross und Barrasso, 1997). Oft reicht eine „blutige“ chirurgische Exstirpation einzelner Warzen, bei der viele Viruspartikel freigesetzt werden, eine Immunantwort zu induzieren, die weitere Warzen vom gleichen Virustyp eliminiert. Dasselbe Prinzip verfolgen Impfungen mit autologen, also aus einzelnen Warzen des selben Organismus isolierte, Vakzinen. Während in der Humanmedizin die autologen Vakzinen keine Rolle bei der Behandlung von papillomvirusinduzierten Tumoren spielen, werden in der Veterinärmedizin besonders bei Rindern und Hunden autologe Vakzinen mit Erfolg eingesetzt (Hofmann, 1992). Diese greifen oft auch bei Tieren desselben Bestands, hingegen haben nicht-stallspezifische Vakzinen aufgrund unterschiedlicher Virustypen und -varianten nur selten Erfolg. Weitere Immuntherapeutika sind insbesondere Interferone, die allerdings mehrfach in Läsionen injiziert werden müssen und dabei starke lokale Irritationen auslösen. Imiquimod ist ein Immunstimulans, das unter dem Handelsnamen „Aldara“ (5% Imiquimod) erfolgreich in der Bekämpfung HPV-induzierter externer genitaler Läsionen (Condylomata acuminata) eingesetzt wird (Miller et al., 1999; Stanley, 1999; Tyring et al., 1998). Die Prävalenz von Condylomata acuminata ist sehr hoch, denn 1-2% der sexuell aktiven Bevölkerung in den USA leiden unter diesen vor allem von HPV 6 und 11 verursachten Warzen (Koutsky et al., 1988). Da viele Betroffene besonders im Frühstadium mit kleinen Papillomen keine ärztliche Behandlung suchen, besteht Bedarf an einem nicht-verschreibungspflichtigen, gut verträglichen, leicht applizierbaren und effizienten Therapeutikum. In diesem Zusammenhang sind erfolgreiche Vorversuche mit PolyphenonTM E durchgeführt worden (klinische Phase III Studie). Dabei handelt es sich um eine definierte Zusammensetzung aus Polyphenolen (Katechinen), die der Hauptbestandteil von chinesischem grünen Tee-Extrakt sind. Polyphenolen ist ein weites Spektrum an pharmazeutisch interessanten Aktivitäten nachgewiesen worden. So wirken sie als Antioxidantien, anti-inflammatorisch, anti-proliferativ, anti-tumorigen, anti-karzinogen und verhindern die Bindung von Viren an Rezeptoren. Die

prophylaktische und therapeutische Wirksamkeit von sowohl topisch als auch oral applizierten Polyphenolen auf entweder chemisch oder durch UV-B-Strahlung induzierte Hauttumoren wurde schon früher im Mausmodell gezeigt (Mukhtar et al., 1994). Ziel meiner Arbeit war, die Wirksamkeit zweier unterschiedlicher PolyphenonTM E Formulierungen auf CRPV-induzierte Hauttumoren im Hauskaninchen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

New Zealand White Kaninchen: Charles River, Kisslegg

2.1.2 Eukaryonte Zellen

SCC13: humane Plattenepithelkarzinomzelllinie (Rheinwald und Beckett, 1981)

3T3 J2: murine Fibroblastenzelllinie (Rheinwald und Green, 1975)

sf1Ep: epitheliale Zelllinie aus der Ohrepidermis eines cottontail rabbits (= CCL68, ATCC, Maryland)

CRL6502: epitheliale Zelllinie aus normaler Haut eines cottontail rabbits (ATCC, Maryland)

primäre humane Keratinozyten: isoliert aus humanen Vorhäuten

2.1.3 Bakterien:

***E.coli* K12-Stamm DH5 α :** bezogen von Clontech (Heidelberg)

***E.coli* TopoF':** Bestandteil TopoTA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.4 Nukleinsäuren

2.1.4.1 synthetisch hergestellte Oligonukleotide:

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Oligonukleotide wurden für Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) einschließlich Echtzeit-PCR, in vitro Mutagenese, Sequenzierungen und Gelretardationsexperimente verwendet. Zur

Klonierung von PCR-Fragmenten wurde ein Teil der Oligonukleotide mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme versehen. Die synthetisch hergestellten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die bei der Echtzeit-PCR (LightCycler) verwendeten markierten Sonden und die dazu gehörigen Primer wurden von TIB Molbiol (Berlin) bezogen.

Tab.1: verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid-Bezeichnung	Orientierung	Quelle	Position	Anmerkung
E2-for	sense	CRPV	3111-3139	BamHI
E2-rev	antisense	CRPV	4284-4254	BamHI
E1-for	sense	CRPV	1362-1390	EcoRI
E1-rev	antisense	CRPV	3171-3143	BamHI
NCR-for	sense	CRPV	7323-7349	SstI
NCR-rev	antisense	CRPV	165-139	NcoI
E9atg	sense	CRPV	1708-1732	RT-PCR
E9 Δ E2Crev	antisense	CRPV	4289-4265	RT-PCR
E9atgEcoRI	sense	CRPV	1714-1730	EcoRI, davor Topo-Vektor-Sequenz
pE7-for	sense	CRPV	1113-1124	LightCycler
pE7-rev	antisense	CRPV	1334-1316	LightCycler
Sonde LC640-E7	sense	CRPV	1285-1310	Sonde LightCycler Red 640
Sonde FL-E7	antisense	CRPV	1259-1275	Sonde LightCycler Fluoreszenin
p α -Tubulin-for	sense	α -Tubulin	633-652	LightCycler
p α -Tubulin-rev	antisense	α -Tubulin	1197-1178	LightCycler
in E4-for	sense	CRPV	3775-3796	LightCycler
in E4-rev	antisense	CRPV	4016-3997	LightCycler
β -Aktin-for	sense	β -Aktin	endogeneus control kit	LightCycler
β -Aktin-rev	antisense	β -Aktin	endogeneus control kit	LightCycler
p685	sense	CRPV	685-708	äußerer Primer Mut. +Sequenzierung
p1926	antisense	CRPV	1926-1903	äußerer Primer Mut. +Sequenzierung
p1822	sense	CRPV	1822-1845	äußerer Primer Mut. +Sequenzierung
p3883	antisense	CRPV	3883-3859	äußerer Primer Mut. +Sequenzierung
E2R37Kmut ^a	sense	CRPV	3205-3235	Mutation: AGA \rightarrow AAA
E2R37Amut ^a	sense	CRPV	3205-3235	Mutation: AGA \rightarrow GCA
E2E39Qmut ^a	sense	CRPV	3211-3241	Mutation: GAA \rightarrow CAA
E2E39Amut ^a	sense	CRPV	3211-3241	Mutation: GAA \rightarrow GCA
E2I73Lmut ^a	sense	CRPV	3313-3345	Mutation: ATA \rightarrow TTA
E2I73Amut ^a	sense	CRPV	3313-3345	Mutation: ATA \rightarrow GCA
MK2AE9del	sense	CRPV	3682-3719	Insertion EcoRI, Methionin, Alanin
E9atgmut ^a	sense	CRPV	1708-1732	Mutation: ATG \rightarrow ACG

E9stop ^a	sense	CRPV	1732-1759	Mutation: TAC→TAG
E2BS1 ^a	sense	HPV31	7470-7496	Oligo für Gelretardationsanalyse
p994	sense	CRPV	994-1016	Sequenzierung
p1314	sense	CRPV	1314-1335	Sequenzierung
p2145	sense	CRPV	2145-2167	Sequenzierung
p2497	sense	CRPV	2497-2518	Sequenzierung
p2803	sense	CRPV	2803-2824	Sequenzierung
p3098	sense	CRPV	3098-3120	Sequenzierung

^a = auch die entsprechenden antisense Oligonukleotide wurden verwendet

2.1.4.2 Plasmide

pSG5-Vektor (Stratagene, Amsterdam): Expressionsvektor mit T7-Bakteriophagen- und frühem SV40 Promotor; Größe: 4,1 kbp

pGL3-basic (Promega, Mannheim): Luziferase-Reportervektor; Größe: 4,8 kbp

pCR®2.1-Topo (Invitrogen, Karlsruhe): Die T-Überhänge erlauben eine einfache Klonierung von PCR-Produkten, T7-Promotor, Größe: 3,9kbp

2.1.4.3 Rekombinante Plasmide

Folgende Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet (s. Abb. 10):

CRPV-pLAll: das CRPV-Gesamtgenom des Washington B Stammes ist in den pLAll-Vektor über seine Sal I Schnittstelle kloniert (Nasseri et al., 1989)

p6xE2Bsluc: E2-abhängiges Luziferase-Reporterplasmid mit 6 E2-Bindungsstellen vor dem frühen SV40 Promotor, der das Luziferasegen treibt (Stubenrauch et al., 1998)

pC18-Sp1-luc: minimales E2-abhängiges Luziferase-Reporterplasmid mit 4 E2-Bindungsstellen und 2 Sp1-Bindungsstellen vor einem adenoviralen Promotor, der das Luziferasegen treibt (Stubenrauch et al., 2001)

pGL31-URR: E2-abhängiges Luziferase-Reporterplasmid, bei dem die nicht-kodierende Region von HPV 31 im pGL3-Basic Vektor (Promega) vorliegt (Stubenrauch et al., 1998).

Folgende Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt:

E2-pSG5: der Leserahmen für das CRPV-E2 Gen (zwischen nt 3111 und 4284) wurde mittels PCR mit den Primern E2-for und E2-rev und CRPV-pLAII als Matrize amplifiziert und in pSG5 kloniert.

E1-pSG5: der Leserahmen für das CRPV-E1 Gen (zwischen nt 1362 und 3171) wurde mittels PCR mit den Primern E1-for und E1-rev und CRPV-pLAII als Matrize amplifiziert und in pSG5 kloniert.

CRPV-NCR-pGL3: die nicht-kodierende Region von CRPV (zwischen nt 7339 und 151) wurde mittels PCR mit den Primern NCR-for und NCR-rev und CRPV-pLAII als Matrize amplifiziert und in pGL3-Basic kloniert.

E2-R37K-pSG5, E2-R37A-pSG5, E2-E39Q-pSG5, E2-E39A-pSG5, E2-I73L-pSG5, E2-I73A-pSG5: von E2-pSG5 abgeleitete Plasmide, bei denen mittels PCR-Mutagenese mit den jeweiligen Mutationsprimern und den äußeren Primern E2-for und E2-rev Punktmutationen in den E2 Leserahmen eingeführt wurden, und die Amplifikate durch Restriktionsverdau mit BamHI in pSG5 kloniert wurden.

E2-R37K-CRPV-pLAII, E2-R37A-CRPV-pLAII, E2-E39Q-CRPV-pLAII, E2-E39A-CRPV-pLAII, E2-I73L-CRPV-pLAII, E2-I73A-CRPV-pLAII: von CRPV-pLAII abgeleitete Plasmide, bei denen mittels PCR-Mutagenese mit den jeweiligen Mutationsprimern und den äußeren Primern p1822 und p3883 Punktmutationen in den E2 Leserahmen eingeführt wurden; anschließend wurden die Amplifikate nach Restriktionsverdau mit den Originalrestriktionsschnittstellen SacI und MluI zurück in CRPV-pLAII kloniert.

E9^ΔE2C-pSG5: das Spleißtranskript E9^ΔE2C (von nt 1721-1751 und 3714-4284) wurde wie im Ergebnisteil beschrieben in den Expressionsvektor pSG5 kloniert.

E9K2A(d3-10)^ΔE2C-pSG5: Deletionsmutante von E9^ΔE2C-pSG5, bei der die Aminosäuren 3-10 von E9 deletiert wurden und die Aminosäure 2 (Lysin) gegen Alanin ausgetauscht wurde, indem eine PCR mit den Primern MK2AE9del und E2-rev und CRPV-pLAII als Matrize durchgeführt wurde und nach Restriktionsverdau mit EcoRI und der Originalrestriktionsschnittstelle MluI das Amplikon in E9^ΔE2C-pSG5 kloniert wurde.

E9atgmut-CRPV-pLAI: von CRPV-pLAI abgeleitetes Plasmid, bei dem mittels PCR-Mutagenese und den Mutationsprimern E9atgmut sowie den äußeren Primern p685 und p1926 das E9 Startcodon mutiert wurde; anschließend wurde das Amplifikat nach Restriktionsverdau mit den Originalrestriktionsschnittstellen AvrII und SacI zurück in CRPV-pLAI kloniert.

E9stop-CRPV-pLAI: von CRPV-pLAI abgeleitetes Plasmid, bei dem mittels PCR-Mutagenese und den Mutationsprimern E9stop sowie den äußeren Primern p685 und p1926 ein Stopkodon in E9 eingeführt wurde; anschließend wurde das Amplifikat nach Restriktionsverdau mit den Originalrestriktionsschnittstellen AvrII und SacI zurück in CRPV-pLAI kloniert.

E9atgmut +E2-I73A mut-CRPV-pLAI: Kombination der Mutationen E9atgmut und I73A in CRPV-pLAI durch Restriktionsverdau von E9atgmut-CRPV-pLAI und E2-I73A-CRPV-pLAI mit AvrII und SacI und anschließender Klonierung des E9atgmut-haltigen Fragments in E2-I73A-CRPV-pLAI.

2.1.4.4 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide

Lachssperma-DNA (Invitrogen, Karlsruhe)

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, Roche, Mannheim)

2.1.5 Größenmarker

DNA Größenmarker: 1kb-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe); λ DNA/Hind III-Fragmente (Invitrogen, Karlsruhe)

RNA Größenmarker: 0,24-9,5 kb RNA-Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)

Protein-Größenmarker: SeeBlue®Plus2 Prestained Protein Standard (Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.6 Enzyme

2.1.6.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen bezogen:

New England BioLabs (NEB), Frankfurt; Invitrogen, Karlsruhe; MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

2.1.6.2 Sonstige Enzyme

Calf Intestinal alkalische Phosphatase (NEB, Frankfurt); T4-Polynukleotidkinase (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen); AmpliTaq Gold-Polymerase (Roche, Mannheim); Vent-DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt); DNaseI (Invitrogen, Karlsruhe); Proteinase K (Invitrogen, Karlsruhe); SuperscriptTM II RNaseH⁻ Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe).

2.1.7 Reagenzien

Fertige Reagenziensysteme:

Qiagen Plasmid Prep (Qiagen, Hilden); Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden); ECL Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences, Freiburg); TaKaRa DNA Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa, Japan) ; Trizol[®] Reagent (Invitrogen, Karlsruhe); TopoTA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe); Aqua Pure Genomic DNA Kit (BioRad, München); NorthernMax-GlyTM Northern Blotting Kit (Ambion, Frankfurt); Qiagen OligotexTM mRNA Mini Kit (Qiagen, Hilden), Ready-To-GoTM RT-PCR-Beads (Amersham Biosciences, Freiburg); DNA Sequencing Kit Big DyeTM (ABI, Warrington, UK); LightCycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I und LightCycler-Fast Start DNA Master Hybridization Probes (Roche, Mannheim); Helios Gene Gun Optimization Kit (BioRad).

2.1.8 Medien

2.1.8.1 Medien für die Zellkultur

DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium): Fertigmedium (Invitrogen), Zusatz von 50 µg/ml Gentamycin (Invitrogen, Karlsruhe) und 10% [v/v] Kälberserum (Invitrogen, Karlsruhe).

E-Medium: E-Medium enthält 3 Teile DMEM (Invitrogen), 1 Teil Ham F12-Medium (Invitrogen), $1,8 \times 10^{-4}$ M Adenin, 1×10^{-10} M Choleratoxin, 0,4 ng/ml Hydrocortison, 5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Transferrin, 2×10^{-11} M Trijodothyronin, 36,5 mM NaHCO₃ (alles Sigma, Taufkirchen), 100 U/ml Penicillin-Streptomycin (Invitrogen). 5% [v/v] HyClone® Fetal Bovine Serum (Pierce). Durch Zugabe von konzentrierter HCL wurde der pH-Wert des Mediums auf 7,1 eingestellt.

Sf1Ep-Medium: sf1Ep-Medium besteht aus 1 Teil M199 (Invitrogen) und 1 Teil Ham F12-Medium (Invitrogen). Zusätzlich enthält es 1nM Dexamethason, 100 pM 17-beta-Östradiol, 1 nM Trijodothyronin, 10 ng/ml PGF2 α (Prostaglandin F2 α), 5 µg/ml Insulin, 10 ng/ml EGF (Mäuse-Epidermal Growth Factor) (alles Sigma, Taufkirchen), 100 U/ml Penicillin-Streptomycin (Invitrogen), 50 mM HEPES, 20 mM NaOH, 5% [v/v] fetales Kälberserum (FKS; Seromed, Berlin) und 7 mM NaHCO₃.

KGM Bullet Kit System: Keratinozytenmedium, Clonetics (St. Katharinen)

Opti-MEM: künstliches serumfreies Medium, Invitrogen.

Trypsin-EDTA: Fertiglösung, Invitrogen.

Mitomycin C: 400 µg Mitomycin C wurden in 1ml PBS gelöst.

Einfriermedium für eukaryonte Zellen: enthält neben dem Kultivierungsmedium die doppelte Menge des entsprechenden Serums und 10 % [v/v] DMSO.

2.1.8.2 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium: 20 g LB Broth Base (Lennox L Broth Base) (Invitrogen) wurden in 1l H₂O gelöst, bei Bedarf wurden 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

LB-Agar: 15 g Select-Agar (Invitrogen) wurden in 1l LB-Medium gelöst, bei Bedarf wurden 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

SOC-Medium: 2% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ und 20 mM Glukose; der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

2.1.9 Antiseren und Antikörper:

Anti-CRPV-E2: polyklonales Kaninchenantiserum gegen CRPV-E2 von F.Wettstein generiert (Barbosa und Wettstein, 1988).

Anti-Kaninchen IgG: Ziege-anti-Kaninchen-IgG Peroxidase gekoppelt (Dako, Dänemark).

2.1.10 Polyphenon™ E Formulierungen:

Creme: 10% Polyphenongehalt, 50% Wasser; Wasser-in-Öl Formulierung, weich, cremig

Salbe: 15% Polyphenongehalt, Wachskomponenten; wasserfrei, klebrig

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienkultur

2.2.1.1 Kulturen für Plasmidisolierung

Zur Vermehrung der *in vitro* rekombinierten Plasmid-DNA diente der *Escherichia coli* Stamm DH5 α . Alle verwendeten Konstrukte enthielten ein Ampicillin-Resistenzgen, weshalb die plasmidhaltigen Stämme auf LB-Agarplatten bzw. in LB-Flüssigmedium unter Zusatz von 100 μ g/ml Ampicillin kultiviert wurden. Als Vorkultur für präparative Plasmidisolierungen dienten 3 ml Übernachtskultur. Zur Extraktion größerer Mengen an DNA wurden 250-500 ml LB-Medium in sterilen Erlenmeyerkolben mit 100 μ l der Vorkultur angeimpft und bei 37°C 12-16 h im Schüttelinkubator bebrütet. Zur Langzeitlagerung wurden die Bakterien mit sterilem Glycerin, Endkonzentration 20% [v/v], vermischt und bei -80° C gelagert.

2.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Fähigkeit zur Aufnahme zirkulärer Plasmid-DNA (Kompetenz) von *Escherichia coli* Bakterien wurde durch eine Behandlung mit CaCl₂, RbCl₂ und MnCl₂ erreicht (Ausubel et al., 1990; Hanahan, 1983). Dabei wurden 490 ml LB-Flüssigmedium mit 10 ml *Escherichia coli* DH5 α einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,45 bei $\lambda=600$ nm im Schüttelinkubator bebrütet. Die Zellen wurden anschließend 30 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml TFB1 (10 mM MES; 100 mM RbCl₂; 10 mM CaCl₂ x 2 H₂O, pH 5,8; 50 mM MnCl₂ x 4 H₂O) resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4500 x g zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 20 ml TFB2 (10 mM MOPS; 10 mM RbCl₂; 75 mM CaCl₂ x 2 H₂O, pH 6,5; 15% Glycerin) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.1.3 Transformation von Bakterien

Die Transformation der Bakterien erfolgte durch Hitzeschock nach dem bei Ausubel et al. (1990) und Maniatis et al. (1989) beschriebenen Protokoll, wobei 50 ng Plasmid-DNA oder 5 µl Ligationsansatz 30 min mit kompetenten DH5α auf Eis inkubiert wurden. Nach dem Hitzeschock (42°C, 60 sek) und einer darauffolgenden Inkubation von 2 min auf Eis wurde 900 µl SOC-Medium zugegeben. Anschließend wurden die Bakterien 30 min in einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert und Aliquots auf ampicillinhaltige LB-Platten ausgestrichen.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung eukaryonter Zellen

Die verwendeten Zellen wuchsen adhärent und wurden als Monolayer-Kulturen in Zellkulturschalen in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ vermehrt. 3T3 J2 wurden in DMEM kultiviert, SCC13-Zellen in E-Medium auf 3T3 J2 Nährzellen, primäre humane Keratinozyten in KGM, sf1Ep-Zellen ebenso wie CRL6502 in sf1Ep-Medium. Alle Zellen wurden spätestens bei Erreichen der Konfluenz im Verhältnis 1:3 bis 1:10 gesplittet. Die Zellen wurden dazu mit 37°C warmer Trypsin-EDTA-Lösung behandelt, bis sie sich vom Boden der Zellkulturschale ablösten. Daraufhin wurde das Trypsin mittels serumhaltigen Mediums inaktiviert und die Zellen auf Schalen mit frischem Medium verteilt (10 ml/ 10 cm Schale, 5 ml/ 6 cm Schale, 2 ml/ 3,5 cm Schale). Für Transfektionsexperimente wurde die genaue Zellzahl durch Zählung eines Aliquots in der Neubauer Zählkammer ermittelt und identische Mengen auf die Zellkulturschalen verteilt.

2.2.2.2 Einfrieren von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden konfluente Zellen in Einfriermedium überführt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, mit serumhaltigen Medium versetzt und bei 500 x g für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 2 bis 4 ml Einfriermedium resuspendiert, je 1 ml in eine Einfrierampulle überführt und diese langsam (1°C/ min Abkühlung) in einer Einfrierbox (Nalgene®) bei -80°C tiefgefroren. Am nächsten Tag wurden die Einfrierampullen in flüssigen Stickstoff umgesetzt.

2.2.2.3 Mitomycin C-Behandlung von 3T3 J2-Zellen

Für die Verwendung von 3T3 J2-Fibroblasten als Nährzellen für SCC13-Zellen wurde die Teilungsfähigkeit der Fibroblasten durch Behandlung mit dem Mitosehemmer Mitomycin C unterbunden. Dazu wurde zu einer konfluenten Schale 3T3 J2-Zellen 100 µl der Mitomycin-Lösung auf 5 ml frisches Kultivierungsmedium gegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Fibroblasten 3 x mit PBS gewaschen, im Verhältnis 1:2 bis 1:6 gesplittet und mit SCC13-Zellen kokultiviert.

2.2.2.4 Transfektion eukaryonter Zellen

Als Transfektionsmethode wurde die Transfektion mit Liposomen gewählt, bei der sich spontan Komplexe zwischen den Liposomen und DNA ausbilden, welche mit der Zellmembran verschmelzen können (Felgner et al., 1987). Am Vortag der Transfektion wurden pro 3,5 cm Zellkulturschale $1-1,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät, pro 6 cm Schale $4-6 \times 10^5$ Zellen. Maximal 2 µg DNA wurden in einem Polystyrol-Röhrchen zu 100 µl (3,5 cm Schale)/ 250 µl (6 cm Schale) Opti-MEM gegeben, in einem weiteren Polystyrol-Röhrchen wurden 5 µl/ 15 µl Lipofektamin™ (Invitrogen, Karlsruhe) zu 100 µl/ 250 µl Opti-MEM gegeben. Die Lipofektamin-Opti-MEM-Lösung wurde zur DNA-Opti-MEM-Lösung hinzupipettiert und vorsichtig mit einer Pipette gemischt. Das Gemisch wurde 30

min bei RT inkubiert, so daß sich DNA-Liposomen-Komplexe bilden konnten. Anschließend wurden 800 µl/ 2 ml Opti-MEM dazugegeben. Die zu transfizierenden Zellen wurden zweimal mit Opti-MEM gewaschen und mit der DNA-Lipofektamin-Lösung überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 5h bei 37°C wurden 1 ml/ 2,5 ml des entsprechenden Zellkultivierungsmediums mit doppeltem Serumgehalt dazugegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.3 Tiermodell

2.2.3.1 Narkose und Infektionsvorbereitung

Die Narkose der Kaninchen erfolgte durch intramuskuläre Injektion von 25 mg/kg Ketaminhydrochlorid und 5 mg/kg Xylazin 2% in einer Mischspritze. Anschließend wurde der Rücken der Tiere erst mit einer Schermaschine und dann mit einem Handrasierer rasiert. Mit einem Handtätowiergerät und schwarzer Tätowierfarbe wurden insgesamt 32 Punkte in vier Segmenten des Kaninchenrückens markiert (s. Abb. 4).

2.2.3.2 Infektion mit CRPV-Viruspartikeln

Um mögliche „resistente“ Kaninchen identifizieren zu können, bei denen sich keine Papillome entwickeln oder bei denen diese kurz nach der Entstehung regredieren, was in bis zu 10% der Kaninchen der Fall ist, wurden einzelne Stellen auf den Kaninchenrücken mit CRPV-Viruspartikeln infiziert. Je Stelle wurden 5 µl einer Virusstocklösung, die $4,8 \times 10^6$ CRPV-Virionen/µl in PBS enthielt, mit einer Tätowiernadel in die Kaninchenhaut eingebracht. Nach Etablierung einer CRPV-DNA-Injektionsmethode mit hoher Tumorinduktionsrate wurde auf die Verwendung von CRPV-Viruspartikeln verzichtet. Der Therapieversuch wurde weiterhin mit Virionen durchgeführt.

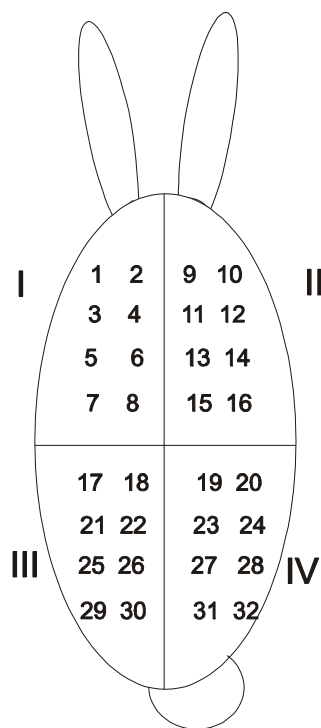


Abb. 4: Schematische Darstellung der Injektions-stellen auf einem Kaninchenrücken

Die Graphik zeigt eine schematische Darstellung des Kaninchenrückens, der in vier Segmente (I-IV) unterteilt wird, in denen sich je bis zu acht Injektionsstellen für CRPV-DNA befinden, die durch die Nummerierung symbolisiert werden.

2.2.3.3 Injektion mit CRPV-DNA

Goldpräzipitate mit CRPV-DNA in Patronen, wie unter 2.2.4.11. beschrieben, wurden mit Hilfe einer „Helios-gene-gun“ (BioRad) und 350 psi Heliumdruckgas in die Haut narkotisierter Kaninchen eingebracht. Je 7 bis 10 µg CRPV-DNA wurden in jede mit einem Tätowierpunkt markierte Stelle transferiert (Xiao et al., 1996).

2.2.3.4 Behandlung der Tumoren mit Polyphenon™ E

Über acht Wochen hinweg wurde einmal täglich fünf Tage pro Woche auf jedes Papillom 125 mg der Polyphenon™ E-Creme oder -Salbe oder des entsprechenden Placebos aufgetragen.

2.2.3.5 Größenbestimmung der Tumoren

Die Größe der auf den Kaninchenrücken entstandenen Tumoren wurde mit Hilfe einer Schublehre bestimmt. Der maximale Durchmesser jedes Tumors wurde 6, 12 und 24 Wochen nach der Infektion/ Injektion bestimmt. Bei den

Therapieversuchen wurde während des Behandlungszeitraums einmal wöchentlich die Tumorfläche gemessen.

2.2.3.6 Entnahme von Tumoren

In regelmäßigen Abständen wurden einzelne Tumoren chirurgisch aus der Haut narkotisierter Kaninchen entnommen, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Hautwunde wurde mit Vicryl (Ethicon) genäht.

2.2.3.7 Euthanasie

Die Kaninchen wurden spätestens 13 Monate nach der Infektion/ Injektion euthanasiert, früher bei beginnender Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens, wie Lahmheit in der Hinterhand oder Ulzeration der Tumoren. Die Euthanasie erfolgte unter Narkose durch intrakardiale Injektion von T61 (Intervet, Schwabenheim).

2.2.4 DNA –Methoden

2.2.4.1 Standardmethoden

Folgende Methoden wurden nach Protokollen, die bei Ausubel et al. (1990) und Maniatis et al. (1989) beschrieben sind, durchgeführt:

- Analytische Isolierung von Plasmid-DNA nach alkalischer Lyse von Bakterien (Minipräparation)
- Aufreinigung der DNA mittels Phenol/ Chloroform
- Ethanol-fällung von DNA und RNA
- Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten mittels alkalischer Phosphatase

- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele, native Polyacrylamidgele)
- Abtrennen freier Nukleotide durch Sephadex G50 Säulen-Chromatographie
- Identifizierung insertragender Plasmide durch Ausstreichen der Klone auf IPTG/ X-Gal-enthaltenden LB-Platten.

2.2.4.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit dem „QIAGEN-Plasmid-Prep-Kit“ und dem „QIAGEN EndoFree®Plasmid Kit“ nach Anleitung des Herstellers. Das DNA-Pellet wurde in H₂O resuspendiert und die DNA-Konzentration mit Hilfe eines Photometers (Eppendorf BioPhotometer; OD258) bestimmt.

2.2.4.3 Fragmentelution aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden in Agarosegelen (SeaKem GTG Agarose, Biozym) elektrophoretisch aufgetrennt, die gewünschten Banden unter UV-Licht ($\lambda=366$ nm) identifiziert und ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit dem „QIAGEN Gel Extraction Kit“ nach Anleitung des Herstellers eluiert und aufgereinigt.

2.2.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Eine PCR ermöglicht die spezifische Amplifikation eines DNA-Fragments, das zwischen zwei bekannten Sequenzen liegt (Saiki et al., 1985). Die PCR-Reaktion wurde meist durch die Vent-DNA-Polymerase katalysiert, da dieses Enzym im Gegensatz zu anderen thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerasen eine 3'→5' korrekturlesende Exonukleaseaktivität besitzt (Lohff und Cease, 1992), die den Einbau von falschen Basen korrigiert. Ein PCR-Ansatz setzte sich bei einem Gesamtvolumen von 50 μ l aus 20 ng Plasmid-DNA, 5 μ l 10 x PCR-Puffer, je 20

pmol Primer, 200 μ M dNTP's und 1 U Vent-Polymerase (New England Biolabs) zusammen. Um einen Volumenverlust durch Verdampfen zu vermeiden, wurde ein PCR-Gerät mit Deckelheizung (MJ Research PTC-200, Biozym, Hess. Oldendorf) verwendet. In der Regel wurden 30 bis 35 Amplifikationszyklen mit den Schritten Denaturierung (96°C, 30 s), Primer-Hybridisierung (50-55°C, 30 s) und Elongation (72°C, 1-2 min) durchgeführt. Vor Beginn der Amplifikation wurde die Matrizen-DNA durch Erhitzen auf 96°C für 5 min denaturiert. Zum Schluß wurde die PCR-Reaktion für 5 min bei 72°C inkubiert. Die Effizienz der PCR-Reaktion wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung von 1/10 Volumen des Reaktionsansatzes überprüft.

2.2.4.5 *In vitro* Mutagenese mit Hilfe der PCR

Mit Hilfe dreier kombinierter PCR-Reaktionen können Punktmutationen in eine DNA-Sequenz eingeführt werden (Higuchi et al., 1988) (s. Abb. 5). In zwei parallelen Ansätzen mit gleicher DNA-Matrize, aber verschiedenen Primern, wurden überlappende Fragmente nach PCR-Standardbedingungen (siehe 2.2.4.4) hergestellt. Ein Überlappungsbereich wurde durch zwei zueinander komplementäre „innere“ Primer erzeugt, von denen je einer in den beiden PCR-Ansätzen verwendet wurde. Diese „inneren“ Primer enthielten die gewünschten Nukleotidsubstitutionen. Nach Amplifikation mit je einem WT-Außenprimer (Wildtyp-Primer) und einem die gewünschten Mutationen-enhaltenden Innenprimer wurden die Fragmente über Agarosegele aufgereinigt (s. 2.2.4.3) und in der dritten PCR-Reaktion vereinigt. Hierbei hybridisierten die Fragmente im Überlappungsbereich und wurden durch die Polymerase zum kompletten Doppelstrang aufgefüllt, welcher anschließend über die Außenprimer amplifiziert werden konnte. Nach Verdau mit randständigen Restriktionsenzymen konnte das mutationshaltige PCR-amplifizierte Fragment zurück ins Ausgangsplasmid im Austausch kloniert werden.

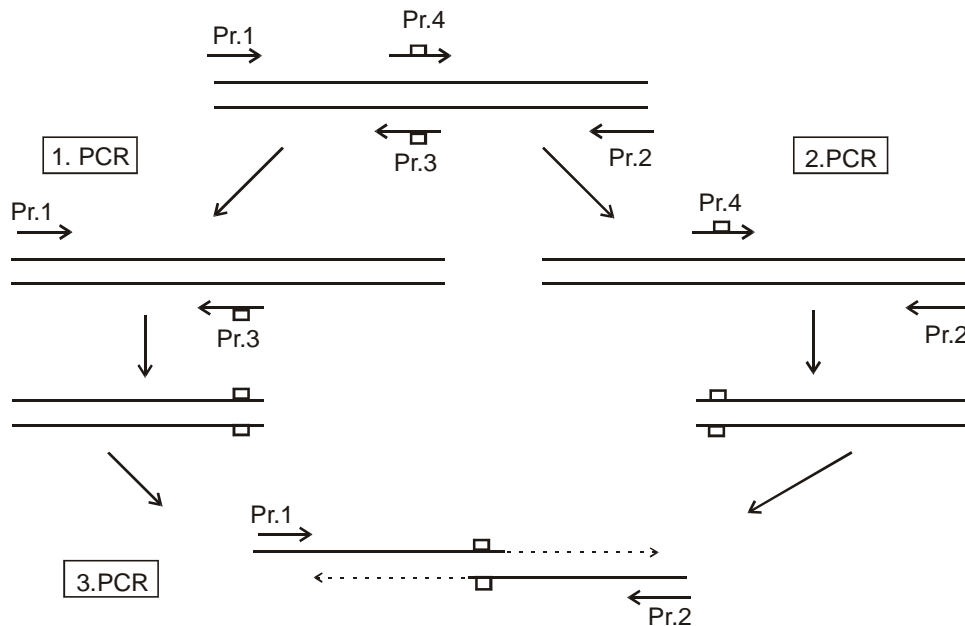


Abb. 5: Schematische Darstellung der Mutagenese-PCRs

In zwei parallelen PCR-Reaktionen (1. und 2. PCR) werden über je einen Innenprimer (Pr.3 oder Pr.4), welcher die gewünschten Basenpaaraustausche trägt, und je einen Außenprimer (Pr.1 oder Pr.2) überlappende Amplifikate erzeugt. In der dritten PCR-Reaktion werden die Außenprimer sowie Aliquots der beiden überlappenden Fragmente eingesetzt. Nach einer Auffüll-Reaktion wird das entstandene Fusionsprodukt mit den Außenprimern amplifiziert. DNA-Einzelstränge sind als Linien, Primer als horizontale Pfeile und die eingeführten Mutationen als Rechtecke dargestellt.

2.2.4.6 Quantitative Echt-Zeit PCR

Bei einer Echt-Zeit PCR kann während der PCR die Menge amplifizierter oder vorhandener doppelsträngiger DNA bestimmt werden. Die quantitative Echt-Zeit-PCR kann im LightCycler (Roche, Mannheim) auf zwei verschiedene Weisen durchgeführt werden. Zum einen mit Hilfe sequenzspezifischer fluoreszenzmarkierter Sonden. Die Sequenz dieser Sonden ist so gewählt, dass sie innerhalb des Amplikons mit einem Abstand von 3-5 Basen zueinander am gleichen DNA-Strang hybridisieren. Die 5'-positionierte Sonde ist am 3'-Ende mit Fluoreszein gekoppelt, die 3'-positionierte Sonde ist an ihrem 5'-Ende mit einem anderen Fluoreszfarbstoff (z.B. LCRed640) gekoppelt. Die räumliche Nähe dieser Sonden während der Hybridisierungsphase ermöglicht nach Anregung eine Energieübertragung des emittierten Lichts von Fluoreszein der einen Sonde auf LCRed640 der anderen Sonde, wodurch Licht in einer spezifischen Wellenlänge emittiert und dessen Stärke am Ende der Hybridisierungsphase

gemessen wird. Zum anderen kann eine Echt-Zeit-PCR mit sequenzspezifischen Primern und SYBRGreen erfolgen, welches sich in doppelsträngige DNA einlagert. Nach Anregung emittiert SYBRGreen Licht einer spezifischen Wellenlänge, dessen Stärke am Ende der Elongationsphase gemessen wird. Der Anstieg der Fluoreszenz, der in jedem Zyklus gemessen wird, ist dem Zuwachs der Amplifikate pro Zyklus proportional. Ersteres wurde mit dem LightCycler-Fast-StartDNA Master Hybridization Probes Kit (Roche), 30 ng DNA, 0,25 μM beider sequenzspezifischen Sonden, je 0,5 μM von zwei sequenzspezifischen Primern, die randständig zu den Sonden liegen müssen und 3 mM MgCl_2 in einem Gesamtvolumen von 20 μl durchgeführt. Die PCR-Bedingungen im LightCycler wurden folgendermaßen eingestellt: Denaturierung bei 95°C für 10 min, Amplifikation 40-45 Zyklen lang mit 10s Denaturierung bei 95°C, 10s Primer-Hybridisierung bei 52-55°C und 20s Elongation bei 72°C. Die quantitative PCR mit SYBR Green wurde mit Hilfe des LightCycler-Fast-StartMaster SYBR Green I Kit (Roche), 0,4 μM jedes sequenzspezifischen Primers und einer 4 mM MgCl_2 Konzentration in einem 15 μl Gesamtansatz durchgeführt. Die PCR-Bedingungen wurden wie bei der Echt-Zeit-PCR mit Sonden gewählt. Um die Spezifität der Amplikons zu überprüfen, wurde zusätzlich im Anschluß noch eine Schmelzkurve im LightCycler bestimmt und mit der Schmelzkurve der gemessenen Standards verglichen. Die Echt-Zeit-PCRs wurden mindestens zweimal mit jeder DNA durchgeführt.

2.2.4.7 DNA-Sequenzierung

Sequenzierung erfolgte mit dem automatischen Sequenziersystem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt). Das System beruht auf der Strangabbruch-Methode von Sanger. Hierbei werden mit Hilfe der Taq-Polymerase in einer PCR fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in neusynthetisierte DNA eingebaut. 1 μg doppelsträngige DNA, 2,5 pmol Primer und 2 μl „BigDyeTM Terminator RR Mix“ (Gesamtvolumen: 10 μl) wurden in einer Sequenzier-PCR eingesetzt und nach Ethanol-Fällung im ABI PRISM 310 Genetic Analyzer sequenziert.

2.2.4.8 Hybridisierung von einzelsträngigen Oligonukleotiden

Zur Hybridisierung zweier komplementärer Oligonukleotid-Stränge wurden je 10 µg zusammen für 5 min bei 95°C erhitzt und danach langsam auf RT abgekühlt.

2.2.4.9 Extraktion extrachromosomaler DNA aus eukaryonten Zellen

Zur Isolierung niedrig-molekularer DNA aus Zellen wurde das Protokoll nach Hirt (1967) modifiziert. Zellen wurden mit 1 ml PBS abgeschabt, 30s mit 20000 x g zentrifugiert, das Pellet wurde in 1 ml eines Lysepuffers (400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL (pH 7,5), 5 mM EDTA) aufgenommen und mit 0,5 % [v/v] SDS und 200 µg Proteinase K mehrere Stunden bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde die NaCl-Konzentration auf 1 M eingestellt, um die hoch-molekulare DNA über Nacht bei 4°C zu fällen und durch Zentrifugation mit 20000 x g für 1 h bei 4°C zu pelletieren. Der Überstand, der die niedrig-molekulare DNA enthielt, wurde mit Phenol-Chloroform und anschließend nur Chloroform aufgereinigt und mit Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde in 20 µl H₂O aufgenommen.

2.2.4.10 Extraktion gesamtzellulärer DNA aus Gewebe

Die Extraktion von DNA aus kleinen Mengen zerkleinerten Tumormaterials erfolgte über einen Proteinase K-Verdau mit 20 µg Proteinase K pro 100 µl Puffer bestehend aus 0,1 M EDTA (pH 8,0), 0,05 M Tris (pH 8,0), 0,5% [v/v] SDS bei 55°C im Schüttelinkubator über Nacht mit anschließender mehrfacher Phenol-Chloroform-Aufreinigung und Ethanol-Fällung. Alternativ wurde DNA mit Hilfe des „Aqua Pure Genomic DNA Kit“ nach Anleitung des Herstellers (BioRad) aus geringen Mengen Tumormaterials isoliert.

2.2.4.11 Präzipitation von CRPV-DNA an Gold-Partikel als Mikrotransportsystem für die Injektion in Kaninchenhaut

Um CRPV-DNA in die Haut von Kaninchen mittels einer „Helios-gene-gun“ einbringen zu können, muß diese an einen Mikrocarrier gebunden werden. CRPV-DNA wurde mit Hilfe des „QIAGEN-EndoFree®Plasmid Kits“ in größeren Mengen gewonnen und in TE-Puffer (10 mM Tris-HCL (pH8,0); 1 mM EDTA) so aufgenommen, dass die Konzentration 1 µg/µl betrug. 50 mg von 1 µm großen Goldpartikeln wurden mit 100 µl 0,05 M Spermidin sonifiziert, es wurden 100 µg der CRPV-DNA hinzugefügt und gemischt. Gold und DNA wurden mit 100 µl 1 M CaCl₂ 10 min bei RT gefällt. Das Gold-DNA-Pellet wurde mehrmals mit 100% Ethanol gewaschen und anschließend in 6 ml 100% Ethanol aufgenommen. Ein Tefzel-Schlauch wurde mit diesem Gold-DNA-Ethanol-Gemisch beschickt. Nach Sedimentation des Goldpräzipitats mit der DNA wurde der Ethanol abgezogen und durch Drehen wurde der Schlauch an der Innenseite gleichmäßig beschichtet. Ethanolreste wurden durch N₂-Gas getrocknet. Der Schlauch wurde in etwa einhundert 1 cm große Patronen unterteilt, von denen jede 1 µg DNA enthielt.

2.2.4.12 Radioaktive Markierung von DNA

2.2.4.12.1 5' Endmarkierung

Die 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden erfolgte durch die T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) (MBI, Fermentas). Dieses Enzym katalysierte den Transfer der terminalen Phosphatgruppe des γ -³²P-ATPs auf das endständige Nukleotid eines doppelsträngigen Oligonukleotids. Die Reaktion lief in folgendem Ansatz ab: 200 ng doppelsträngiges Oligonukleotid, 2 µl 10 x Forwardpuffer, 5 µl Adenosin 5'-[γ -³²P]-Triphosphat (10 µCi/µl) (Amersham Biosciences), 1 µl T4-PNK und H₂O ad 20 µl. Nach 30 min bei 37°C wurden freie Nukleotide durch Reinigung mit einer Sephadex G50-Säule (NucTrap®Probe Purification-Säule, Stratagene, Amsterdam) entfernt.

2.2.4.12.2 Durchgehende Markierung

Für die Verwendung in Southern- und Northern-Blot-Hybridisierungen wurden etwa 80 ng linearisierte DNA mit 50 μ Ci Deoxycytidin 5'-[α^{32} P]-Triphosphat (spezifische Aktivität 6000Ci/mmol; Amersham Biosciences) und „Ready-To-Go DNA labelling beads (-dCTP)“ (Amersham Biosciences) nach Anleitung des Herstellers markiert und anschließend über eine Sephadex G50-Säule (NucTrap®Probe Purification-Säule, Stratagene) aufgereinigt.

2.2.4.13 DNA-Blot-Hybridisierungen nach Southern

Der Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen aus Biopsiematerial oder aus transienten Replikationsassays erfolgte nach der Methode von Southern (1975). Dazu wurde die DNA mit Restriktionsenzymen gespalten und auf einem 0,8%igem Agarosegel bei 60V für 14 h elektrophoretisch aufgetrennt. Nach 30 min Inkubation in 0,25 M HCl bei RT auf einem Horizontalschüttler wurde ein aufwärts gerichteter DNA-Transfer auf eine GeneScreenPlus® Nylon-Membran (NEN) mit Hilfe von 0,4 M NaOH als Transferpuffer für 5-6 h durchgeführt. Anschließend wurde die Membran in 2 x SSC gewaschen und für 30 min in einem Inkubator bei 80°C getrocknet. Mit 20 ml Hybridisierungslösung (4 x SSPE, 5 x Denhardt's, 10% Dextransulfat) und 300 μ l Lachssperma-DNA wurde die Membran in einem Hybridisierungskubator bei 42°C für mindestens 1 h prähybridisiert. Hybridisierung mit der 32 P- markierten DNA-Sonde (10×10^6 cpm (counts per minute = Zerfälle pro Minute)) fand in 10 ml Hybridisierungslösung mit 200 μ l Lachssperma-DNA im Hybridisierungskubator bei 42°C über Nacht statt. Am nächsten Tag fanden je zwei Waschungen der Membran in drei verschiedenen Lösungen statt: Waschlösung A: 2 x SSC, 0,1% SDS, RT, 15 min; Waschlösung B: 0,1 x SSC, 0,1% SDS, RT, 15 min; Waschlösung C: 0,1 x SSC, 1% SDS, 50°C, 20 min. Danach wurde die hybridisierte DNA mit Hilfe eines Röntgenfilms oder des Phosphoimagers Fuji BAS 1800 sichtbar gemacht und mit Hilfe der Software AIDA quantifiziert.

2.2.5 RNA-Methoden

2.2.5.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Die Isolierung gesamtzellulärer RNA erfolgte nach der von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebenen Methode der sauren Phenolextraktion unter Verwendung einer monophasischen Phenol- und Guanidinisocyanatlösung (Trizol®, Invitrogen, Karlsruhe) nach Anleitung des Herstellers. Nach Fällung der RNA mit Isopropanol und Waschen mit 75%-igem Ethanol wurde das RNA-Pellet in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem H₂O aufgenommen. Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurden 3 µg des RNA-Isolats mit RNA-Probenpuffer (50% Formamid; 2,2 M Formaldehyd; 1 x MOPS-Puffer (20 mM MOPS (pH 7,0); 5 mM Na-Acetat; 1 mM EDTA); 0,05% [v/v] Bromphenolblau) versetzt und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.5.2 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (1-Schritt-RT-PCR)

Die reverse Transkription der RNA mit anschließender PCR-Amplifikation ermöglicht die Amplifikation vorhandener Transkripte. Die RT-PCR wurde in einem Ansatz in einer Reaktion (sogenannte „one-step RT-PCR“) mit Hilfe der Ready-To-Go™ RT-PCR beads von Amersham Biosciences durchgeführt. Zu diesen Fertigansatzkügelchen wurden noch je 20 pmol Primer, 100-500 ng Gesamt-RNA hinzugefügt und mit DEPC-H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Die reverse Transkriptionsreaktion fand in einem PCR-Gerät bei 42°C für 1 h statt. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase folgte ein zehnminütiger Inkubationsschritt bei 95°C. Es schloß sich direkt die Amplifikation nach dem üblichen PCR-Protokoll (s. 2.2.4.4) an.

2.2.5.3 2-Schritt-RT-PCR

1. Schritt: cDNA Synthese

Für die cDNA-Synthese aus isolierter RNA wurde diese zuerst mit Desoxyribonuklease I (Invitrogen, Karlsruhe) bei Raumtemperatur 15 min inkubiert und anschließend mit 3 M Natriumacetat und Ethanol gefällt. Darauf erfolgte die reverse Transkription mit der Superscript™ II RNaseH⁻Reverse Transkriptase (Invitrogen) und Oligo-(dT) Primern nach Anweisung des Herstellers bei 42°C für 50 min mit anschließender Inaktivierung bei 70°C für 15 min und Natriumacetat- und Ethanol-Fällung.

2.Schritt: PCR am LightCycler

Die so gewonnene cDNA wurde in quantitativen PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern eingesetzt.

2.2.5.4 PolyA⁺mRNA-Isolation aus gesamtzellulärer RNA

Die Isolierung von PolyA⁺mRNA aus gesamtzellulärer RNA erfolgte mit dem „Oligotex mRNA Kit“ (QIAGEN, Hilden) nach Anleitung des Herstellers. Prinzip ist die Bindung des poly-A Schwanzes von mRNA an dT-Oligomere, die an Polystyren-Latex Partikel kovalent gebunden sind, wodurch die Isolation und anschließende Elution von mRNA ermöglicht wurde.

2.2.5.5 Northern-Blot-Hybridisierung

Der Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen in den isolierten polyA⁺mRNAs erfolgte mit dem „Northern Max-Gly™ Northern Blotting Kit“ (Ambion, Frankfurt) nach Anleitung des Herstellers. Das Prinzip ist bei Alwine, Kemp and Stark, 1977 beschrieben. Je 600 ng der isolierten polyA⁺mRNA (s. 2.2.5.4) wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine GeneScreenPlus® Nylon-Membran (NEN) Membran transferriert, mit einer ³²P-markierten CRPV-DNA-Sonde hybridisiert (s. 2.2.4.12.2) und nach mehreren Waschschritten auf einem Röntgenfilm oder im Fuji BAS 1800 Phosphorimager sichtbar gemacht.

2.2.6 Protein-Methoden

2.2.6.1 Standardmethoden

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Protokollen, die bei Sambrook et al., 1989 und Ausubel et al., 1990 beschrieben sind, durchgeführt.

2.2.6.2 Nukleäre Extrakte aus Säugerzellen

Für die Gewinnung von Kernproteinen wurde eine Methode gewählt, die auf die schnelle Extraktion intakter, funktionell aktiver Faktoren ausgerichtet ist (Sealey und Chalkley, 1987). Für die Extraktion wurden die Zellen in einer 6 cm-Zellkulturschale einmal mit PBS gewaschen, in 1 ml kaltem PBS mit einem Gummischaber abgeschabt und durch Zentrifugation pelletiert (20000 x g, 30s, 4°C). Das Zellpellet wurde 5 min auf Eis in 250 µl Lysispuffer aufgeschlossen (10 mM Hepes (pH 7,9), 300 mM Saccharose, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM EGTA, 0,5% [v/v] Igepal CA630, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0,5 mM Natriumorthovanadat, 50 mM NaF und Proteinaseinhibitoren (Sigma Aldrich)). Die intakten Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 3000 x g und 4°C für 5 min pelletiert. Die nukleären Proteinextrakte wurden daraus durch 30-minütige Inkubation auf Eis in 30 µl Elutionspuffer gewonnen (20% [v/v] Glycerol, 10 mM Hepes (pH 7,9), 500 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM NaF, 0,5 mM Natriumorthovanadat und Proteinaseinhibitoren). Nach Zentrifugation bei 16000 x g und 4°C für 5 min wurde der Überstand, der die Kernproteinextrakte enthielt, in einem Trockeneis-Ethanol Gemisch schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.6.3 Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot dient dem Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper (Burnette et al., 1981). Die Proteine wurden in 12%-igen SDS-

Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham Pharmacia) mittels Elektroblot erfolgte in CAPS-Transferpuffer (10 mM 3-(Cyclohexylamino)-1-Propansulfonsäure (CAPS); 10% Methanol (pH 10,3) [v/v]) bei 70V für 2 h. Durch Inkubation der Nitrozellulosemembran in 5%-igem [w/v] Milchpulver in TBS mit 0,1% Tween 20 [v/v] (MTBS-T) über Nacht bei 4°C wurden freie, unspezifische Bindungen abgesättigt. Dann wurde die Membran 2 h lang mit 1:1000 in MTBS-T verdünntem Primärantikörper inkubiert und nach mehrmaligen Waschen mit TBS-T wurden die gebundenen Antikörper durch einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Dazu wurde die Membran in diesem 1:1500 in MTBS-T verdünnten Sekundärantikörper eine weitere Stunde inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in TBS-T wurden die Proteine mittels Chemolumineszenz (ECL, Amersham Biosciences) nachgewiesen und durch einen Röntgenfilm sichtbar gemacht (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences).

2.2.6.4 Luziferase- Expressionsanalyse

Der „Luziferaseassay“ ist eine Methode zur Analyse transkriptionsmodulierender Proteine. Hierzu werden genregulatorischen Sequenzen in einen Reportervektor (pGL3-basic) oberhalb des Luziferasegens kloniert. Entsprechende Reporterplasmide werden dann alleine oder zusammen mit eukaryonten Expressionsplasmiden in Zellen in 3,5 cm Kulturschalen durch Lipofektamin eingebracht. Nach 48h werden die Zellen durch Zugabe von 150 µl Lysispuffer (0,1 M Kaliumphosphat (pH7,8), 1% Triton X-100 [v/v], 1 mM DTT) aufgeschlossen. Die Luziferaseaktivität von 20 bis 40 µl der Extrakte wurde in einem Luminometer (Fa. Berthold) in 100µl Enzympuffer (0,1 M Kaliumphosphat (pH7,8), 1 mM DTT, 5 mM rATP, 15 mM MgSO₄, 1 mM D-Luciferin) bestimmt (Messdauer 5s) (Ausubel et al., 1998). Diese transienten Luziferaseexpressionsassays wurden für jede Sequenz mindestens 3 bis 5 mal in Doppelbestimmungen wiederholt.

2.2.7 DNA-Protein-Interaktion

2.2.7.1 Gelretardationsanalyse

Diese Methode (modifiziert nach Fried und Crothers, 1981) dient der direkten Darstellung von DNA-Protein-Komplexen. Sie beruht auf dem Prinzip, dass DNA, die mit einem oder mehreren Proteinen assoziiert ist, in einem nativen Polyacrylamidgel eine wesentlich kürzere Wanderungstrecke zurücklegt („Verzögerungseffekt“) als die entsprechenden ungebundenen DNA-Sequenzen. Ausschlaggebend für das Wanderungsverhalten sind dabei Molekülgröße und Ladung der komplexierten Proteine. Ein repräsentativer Ansatz setzte sich bei einem Gesamtvolumen von 20 µl aus 5 µl Kern-Proteinextrakten, die aus transfizierten Zellen isoliert wurden (s. 2.2.6.2), aus 20000 cpm eines ³²P-endmarkierten doppelsträngigen Oligonukleotids (s. 2.2.4.12.1.) und Endkonzentrationen von 10 mM Hepes (pH 7,9), 20% Glycerol [v/v], 100 mM KCl, 1,5 mM DTT und 2 µg Poly(dl-dC) zusammen. Das Reaktionsgemisch wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend in einem 7%-igen nativen Polyacrylamidgel (55 Teile Acrylamid auf 1 Teil Bisacrylamid) mit 0,25 x Tris-Borat-EDTA (1 x TBE: 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) als Laufpuffer elektrophoretisch bei 200 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel getrocknet und autoradiographiert oder in einem Phosphorimager (Fuji BAS 1800) sichtbar gemacht und quantifiziert.

3 Ergebnisse

3.1 Gezielte Mutagenesen in CRPV-E2 und Charakterisierung der Mutanten *in vitro*

Bereits bei BPV 1, HPV 11, 16, 18 und 31 konnte gezeigt werden, dass durch die Mutation einzelner hoch konservierter Aminosäuren im N-Terminus des zentralen Regulatorproteins E2 die Funktionen Unterstützung der viralen DNA-Replikation und Transaktivierung der Transkription genetisch voneinander getrennt werden können. So führt Mutation der Aminosäure 37 (Arginin [R]) oder der Aminosäure 73 (Isoleucin [I]) von E2 dieser Papillomviren zu einem Verlust der Transaktivierungsaktivität bei erhaltener Replikationseffizienz, Mutation der Aminosäure 39 (Glutaminsäure [E]) hat den umgekehrten Effekt (Brokaw et al., 1996; Cooper et al., 1998; Harris und Botchan, 1999; Sakei et al., 1996; Stubenrauch et al., 1998). Ziel der im folgenden beschriebenen Versuche ist es, entsprechende Mutationen in CRPV-E2 einzuführen und ihren Einfluß auf Transaktivierungs- und Replikationseffizienz zu untersuchen.

3.1.1 Einführung gezielter Mutationen in CRPV-E2

Auch in CRPV-E2 sind die Aminosäuren 37, 39 und 73 verglichen mit allen bisher untersuchten E2 konserviert. Mit Hilfe von Mutagenese-PCRs wurden die für diese Aminosäuren in CRPV-E2-pSG5 kodierenden Tripletts entweder durch ein Triplet, das für Alanin kodiert, (E2-R37A-pSG5, E2-E39A-pSG5 bzw. E2-I73A-pSG5) oder durch eins, das für die chemisch ähnlichste Aminosäure kodiert, ausgetauscht: Arginin durch Lysin (E2-R37K-pSG5), Glutaminsäure durch Glutamin (E2-E39Q-pSG5), Isoleucin durch Leucin (E2-I73L-pSG5) (s. Abb.3). Alle Mutationen und PCR-amplifizierten Genbereiche wurden sequenziert und mit der Ausgangssequenz verglichen.

3.1.2 Stabile Expression der mutierten CRPV E2-Proteine

Die stabile Expression der mutierten E2-Proteine wurde mittels Western-Blot-Analyse in Extrakten aus transfizierten Zellen überprüft. Dazu wurden sf1Ep Zellen, eine epitheliale Zelllinie aus einem cottontail rabbit, in 6 cm Schalen mit 1 µg Wildtyp E2-pSG5 bzw. je 1 µg eines der mutierten E2-Expressionsvektoren oder des leeren pSG5 Vektors transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden nukleäre Extrakte isoliert und identische Volumina davon in einem Western-Blot eingesetzt. Als Antikörper diente ein polyklonales CRPV-E2 Antiserum. Eine einzelne spezifische Bande in Höhe von etwa 50 kD konnte identifiziert werden, die in den Extrakten aus nur mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen fehlte. Auch wich die Größe von den errechneten 45 kD für CRPV-E2 nicht stark ab. Die in CRPV-E2 eingeführten Mutationen verursachten also keine deutliche Proteininstabilität (Abb. 6A).

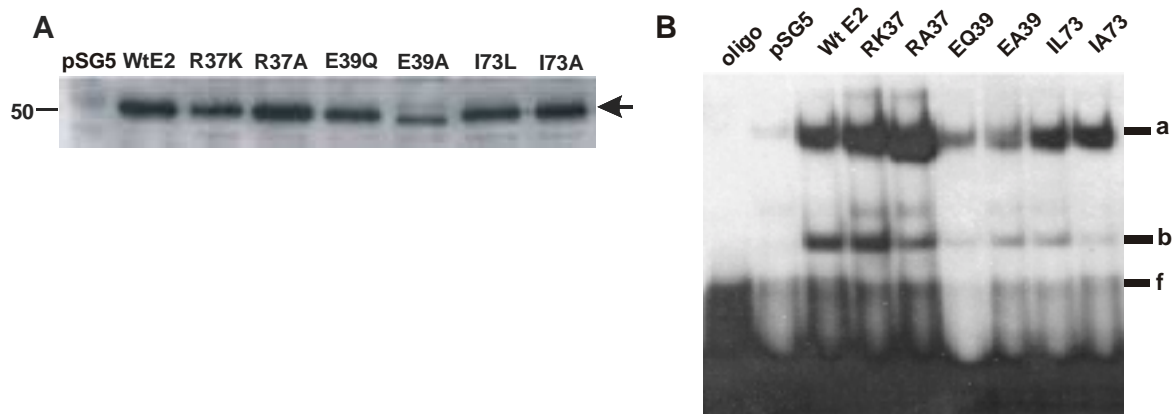


Abb. 6: (A) Western-Blot-Nachweis der E2-Mutanten in nukleären Extrakten transfizierter Zellen

sf1Ep Zellen wurden mit jeweils 1 µg CRPV Wt-E2-pSG5 oder den E2-Mutanten R37K-, R37A-, E39Q-, E39A-, I73L- und I73A-pSG5 transfiziert. Identische Volumina an nukleären Extrakten wurden mit einem polyklonalen CRPV-E2 Antikörper nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente Extrakt von Zellen, die mit dem leeren pSG5-Vektor transfiziert wurden. Der Pfeil zeigt die Position der E2-Proteine an. Die Größe des Molekulargewichts-Standards ist in Kilodalton (links) angegeben.

(B) Gelretardationsanalyse der Bindungsfähigkeit der E2-Mutanten an eine E2-Bindestelle

Identische Volumina der nukleären Extrakte wurden einer Gelretardationsanalyse unterzogen. Als Negativkontrollen wurde das ³²P-markierte Oligonukleotid in einer Spur ohne Proteinextrakt aufgetragen (oligo), in einer anderen mit Proteinextrakt aus Zellen, die nur mit dem leeren Vektor transfiziert waren (pSG5). a und b geben die Positionen der E2-DNA-Komplexe an, f das freie, ungebundene ³²P-markierte Oligonukleotid, das eine E2-Bindestelle beinhaltet.

3.1.3 DNA-Bindungsfähigkeit der mutierten E2-Proteine

Alle bekannten Funktionen des E2-Proteins setzen die Fähigkeit voraus, dass E2 mit seinem C-Terminus an die palindromische DNA-Sequenz ACCN₆GGT spezifisch binden kann (McBride et al., 1991). Mittels eines Gelretardationsassays wurde die Fähigkeit der mutierten E2-Proteine in nukleären Extrakten aus transfizierten sf1EP Zellen (siehe 3.1.2.) untersucht, an ein mit ³²P 5'-endmarkiertes Oligonukleotid, das eine E2-Bindestelle enthält, zu binden. Es konnten sowohl im Extrakt der mit Wildtyp transfizierten als auch in jedem der mit Mutanten transfizierten Zellen zwei spezifische Komplexe identifiziert werden, die in den Extrakten der mit leerem Expressionsvektor transfizierten Zellen fehlten. Der zweite Komplex (b) kann eventuell auf eine stattgefundene Degradation oder posttranslationale Veränderungen der E2-Proteine zurückgeführt werden. Es konnte also gezeigt werden, dass Mutation der Aminosäure 37, 39 oder 73 von CRPV-E2 keine gravierende Auswirkung auf die sequenzspezifische DNA-Bindungsfähigkeit hat (Abb. 6B). Die anscheinend schwächere Bindungsstärke der E39Q Mutante in Abb. 6B bestätigte sich in wiederholten Experimenten nicht.

3.1.4 Auswirkung der Mutationen in CRPV-E2 auf die Transaktivierungsaktivität

Es wurde schon früher gezeigt, dass CRPV-E2 synthetische Reporterkonstrukte mit mehreren E2-Bindungsstellen vor einem minimalen Promotor transaktiviert, ebenso transaktiviert es die NCR von CRPV mit dem späten (PL) und den ersten beiden frühen Promotoren (P1, P2) (Fujii et al., 2001; Giri et al., 1988). Die Transaktivierungseffizienz von CRPV-E2 bzw. von den erstellten Mutanten wurde mittels eines Luziferaseassays ermittelt. Dazu wurden SCC13 Zellen, eine Plattenepithelkarzinomzelllinie, in 3,5cm Zellkulturschalen mit 200 ng des synthetischen Reporterplasmids p6xE2BS-luc transfiziert, das aus sechs E2-Bindestellen vor einem frühen SV40 Promotor besteht, der das Luziferasegen

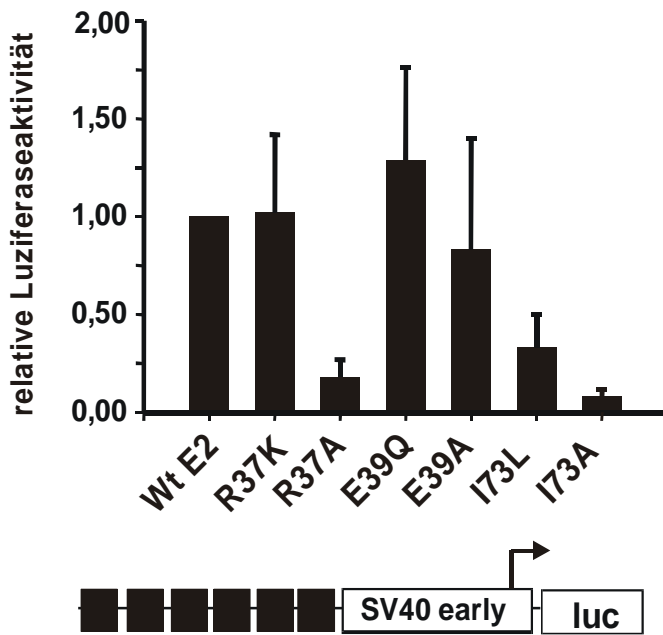


Abb.7: Transaktivierungsaktivität der E2-Mutanten in transienten Luziferase-Reporterassays

SCC13 Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für CRPV Wt-E2 oder für die E2-Mutanten R37K, R37A, E39Q, E39A, I73L oder I73A und dem E2-abhängigen Reporter-plasmid p6xE2BS-luc transfiziert und die jeweilige Luziferaseaktivität wurde bestimmt. Das Reporter-plasmid, das unterhalb der Graphik schematisch dargestellt wird, besteht aus sechs E2-Bindestellen (schwarze Quadrate) vor einem frühen SV40 Promoter (SV40), der das Luziferasegen (luc) treibt. Die Balken geben die relative Luzifera-seaktivität bezogen auf Wt E2 an, dessen Aktivität gleich 1 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider.

treibt (Abb. 7 unten). Mit 10 ng Wildtyp-E2-pSG5 oder Mutanten-E2-pSG5 oder leerem Expressionsvektor pSG5 wurden die Zellen kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Luziferaseaktivitäten des Reporterkonstrukts im Luminometer bestimmt. Der Wert nach Kotransfektion mit dem leeren pSG5-Vektor entsprach der Basalaktivität des Reporterplasmids. Diese Basalaktivität wurde durch Kotransfektion mit Wildtyp-E2-pSG5 um durchschnittlich das sechzigfache erhöht. Kotransfektionen mit den Mutanten E2-R37A-pSG5 oder E2-I73A-pSG5 erreichten hingegen nur 18% bzw. 8% der Luziferaseaktivität, die nach Kotransfektion mit Wildtyp-E2 vorlag. Mutation von Isoleucin an Position 73 von E2 zur biochemisch ähnlicheren Aminosäure Leucin hingegen reduzierte die Luziferaseaktivität nur auf 33% der Wildtyp-Aktivität, und Austausch von Arginin 37 gegen Lysin zeigte keinerlei Auswirkung auf die Transaktivierungseffizienz. Auch Mutation von Glutaminsäure 39 zu Glutamin oder Alanin hatte keinen deutlichen Einfluß auf die Transaktivierungseffizienz (Abb. 7). Dies ist in Übereinstimmung mit Befunden bei BPV 1, HPV 11, 16, 18 und 31 (Brokaw et al., 1996; Cooper et al., 1998; Harris und Botchan, 1999; Sakei et al., 1996; Stubenrauch et al., 1998).

3.1.5 Replikationseffizienz der CRPV-E2 Mutanten

Ein transienter Replikationsassay wurde durchgeführt, bei dem die Effizienz der E1- und E2-abhängigen Replikation des CRPV-Replikationsursprungs bestimmt wurde. Dazu wurden SCC13 Zellen in 6 cm Zellkulturschalen mit je 500 ng eines Konstrukts transfiziert, das die vollständige NCR von CRPV (CRPV -NCR-pGL3) inklusive des von Chiang et al., 1992, bestimmten Replikationsursprungs in einem pGL3-basic-Vektor enthält. Kotransfektionen wurden mit je 1 µg des Expressionsplasmids für CRPV-E1 (E1-pSG5) sowie zusätzlich je 200 ng eines Expressionsplasmids für entweder Wildtyp-E2-pSG5 oder Mutanten-E2-pSG5 durchgeführt. Extrachromosomale DNA wurde 72h nach der Transfektion nach dem Protokoll von Hirt, 1967, isoliert. Diese DNA wurde dann mit DpnI gespalten, um in den Zellen replizierte DNA von der transfizierten Ausgangs-DNA aus Bakterien unterscheiden zu können. Zusätzlich wurde die zu quantifizierende CRPV -NCR-pGL3-DNA mit HpaI linearisiert. Anschließend wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und ein Southern Blot durchgeführt. Als Sonde wurde HpaI linearisierte CRPV -NCR-pGL3-DNA durchgehend mit ³²P markiert und 10 x 10⁶ cpm eingesetzt. Nur nach Kotransfektion sowohl mit E1-pSG5 als auch mit E2-pSG5 konnte zellulär replizierte CRPV -NCR-pGL3 nachgewiesen werden. Schon früher wurde beschrieben, dass das Fehlen eines dieser beiden Proteine keine transiente Replikation zulässt (Stenlund, 1996). Wie man in Abb. 8 sieht, waren die Mutanten E2-R37K-pSG5, E2-R37A-pSG5, E2-I73L-pSG5 und E2-I73A-pSG5 in der Lage, die Replikation des replikationsursprungshaltigen Plasmids CRPV-NCR-pGL3 auf 42%-91% des Wildtyp-E2-Niveaus zu stimulieren. E2-E39Q-pSG5 und E2-E39A-pSG5 hingegen stimulierten die Replikation deutlich geringer, sie erreichten nur 18% bzw. 13% des Wildtyp-E2-Niveaus. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich Mutationen der hoch konservierten Aminosäuren 37, 39 und 73 von CRPV-E2 ähnlich verhalten wie die entsprechenden Mutationen bei anderen Papillomviren: Mutation der Aminosäure 37 (Arginin) zu Alanin oder der Aminosäure 73 (Isoleucin) zu Leucin oder Alanin zog einen Verlust der Transaktivierungseffizienz bei nahezu erhaltener Replikationseffizienz nach sich.

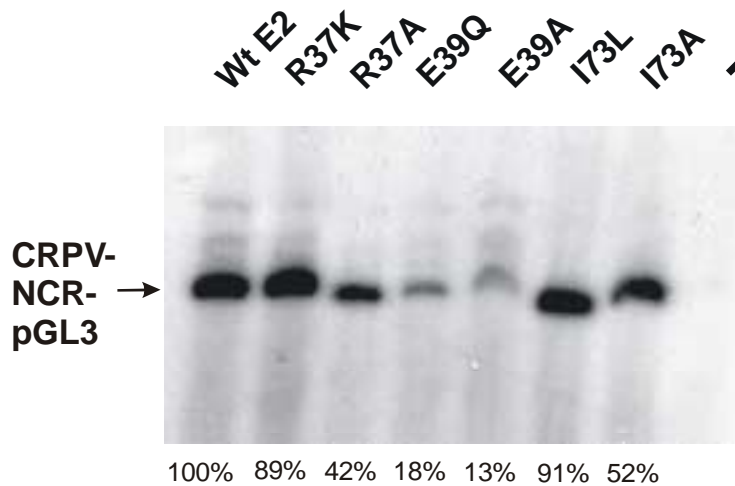


Abb. 8: Replikationseffizienz der E2-Mutanten in transienten Replikationsassays

SCC13 Zellen wurden nur mit dem Plasmid CRPV-NCR-pGL3 alleine (-) oder zusätzlich mit dem Expressionsvektor für CRPV-E1 und dem für CRPV-Wt-E2 oder einem der Mutanten-E2 Expressionsvektoren R37K, R37A, E39Q, E39A, I73L oder I73A transfiziert. Niedrig-molekulare DNA wurde extrahiert und nach Restriktionsverdau mit DpnI und HpaI mittels Southern-Blot-Hybridisierung analysiert. Der Pfeil zeigt die Position der DpnI-resistenten CRPV-NCR-pGL3-DNA an. Die Prozentwerte geben die relative Menge an repliziertem Ursprungsplasmid an, wobei die Menge aus mit Wt-E2 transfizierten Zellen gleich 100% gesetzt wurde.

Mutation der Aminosäure 39 (Glutaminsäure) zu entweder Glutamin oder Alanin zeigte den umgekehrten Effekt: Verlust der Replikationseffizienz bei erhaltener Transaktivierungseffizienz.

3.2 Identifizierung eines unbekanntes Transkripts in CRPV-induzierten Tumoren und Charakterisierung seiner Funktionen *in vitro*

Transkripte, die für ein E2-Repressorprotein kodieren, wurden schon früher in BPV 1, HPV 11, 16, 31 und 33 infizierten Zellen gefunden (Choe et al., 1989; Doorbar et al., 1990; Hubbert et al., 1988; Rotenberg et al., 1989; Snijders et al., 1992; Stubenrauch et al., 2000). Gemeinsam ist diesen Transkripten, dass sie aus der Hinge-Region und dem C-Terminus von E2 bestehen, denen durch alternatives Spleißen ein kleines E8-Gen vorgesetzt ist, dessen Leserahmen überlappend zu E1 liegt. Dieses E8-Gen kodiert je nach Virustyp vor dem Spleiß für 10-12 Aminosäuren. Sequenzanalyse der CRPV-DNA suggerierte, dass auch bei CRPV ein vergleichbares Transkript exprimiert werden könnte. Es wurde versucht, dieses in CRPV-induzierten Tumoren nachzuweisen.

3.2.1 Identifizierung eines neuen Transkripts in CRPV

Aus CRPV-induzierten Papillomen und Karzinomen von Hauskaninchen sowie aus einem Papillom eines cottontail rabbits wurden RNAs isoliert und jeweils als Matrize in einer RT-PCR mit den Primern E9atg und p3883, die den möglicherweise genutzten Spleiß einrahmen, eingesetzt. Ein Fragment von 200 bp Länge konnte in den RNAs aller Biopsien amplifiziert werden, das zur genaueren Bestimmung in den pCR®2.1-Topo Vektor kloniert und anschließend sequenziert wurde. Die Analyse dieser Sequenz zeigte, dass in der Tat der Spleißdonor bei nt 1751 im überlappenden Leserahmen zu E1 und der Spleißakzeptor bei nt 3714 im Leserahmen von E2 genutzt wurde. Zur Kontrolle, ob diese neu gefundene gespleißte cDNA das gesamte 3'-Ende von E2 enthält, wurde eine weitere RT-PCR mit RNA aus einem Papillom eines Hauskaninchens und den Primern E9atg und E9^ΔE2Crev durchgeführt. Das amplifizierte Fragment von 600 bp Länge, welches das gesamte 3'-Ende von E2 enthielt, wurde erneut in den pCR®2.1-Topo Vektor kloniert. Durch PCR mit den Primern E9atgEcoRI und E2rev, die Restriktionsschnittstellen für EcoRI beziehungsweise BamHI beinhalten, erfolgte anschließend eine Umklonierung in den Expressionsvektor pSG5. Dieses Konstrukt, das die cDNA von dem vermutlichen Startkodon von E9 über den Spleiß bis zum 3'-Ende von E2 im Expressionsvektor pSG5 enthält, wurde sequenziert und analog zu dem vergleichbar aufgebauten E8^ΔE2C bei HPV 31 als E9^ΔE2C-pSG5 bezeichnet. Das neu gefundene Gen, das vor dem Spleiß für 10 Aminosäuren kodiert, wurde E9 genannt, da es im CRPV Genom bereits ein E8-Gen gibt, welches in einem überlappenden Leserahmen zu E6 liegt (Abb. 9). Das E9^ΔE2C-pSG5-Konstrukt wurde anschließend funktionell charakterisiert.

3.2.2 Wirkung von CRPV-E9^ΔE2C auf verschiedene Promotorkonstrukte

Frühere Studien zeigten, dass E8^ΔE2C von BPV 1 die Promotoren der nicht-kodierenden Region von BPV1 reprimiert (Choe et al., 1989). Ebenso reprimiert E8^ΔE2C von HPV 31 seinen natürlichen homologen Promotor p97, sowie auch

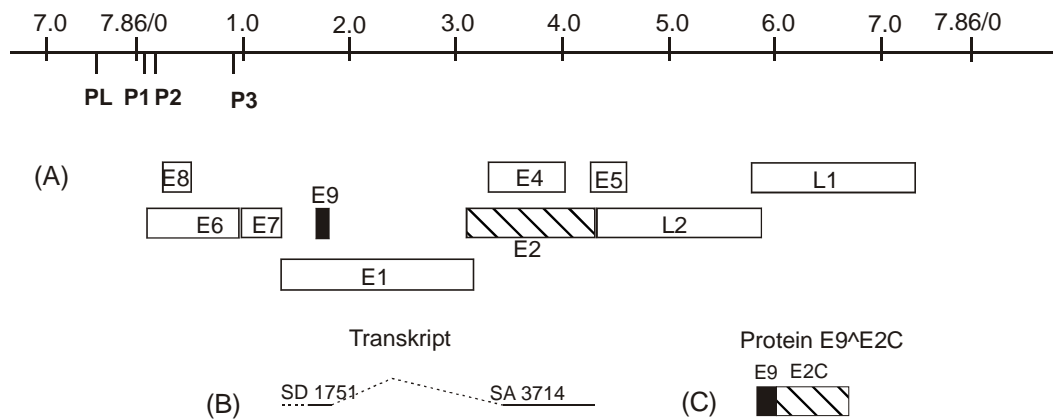


Abb. 9: Isolation einer cDNA für E9^{E2C} aus RNA von Kaninchentumoren

- (A): Die Graphik zeigt das linearisierte Genom von CRPV, die Rechtecke symbolisieren die offenen Leserahmen.
- (B): Das Transkript E9^{E2C} mit Spleißdonor (SD) und -akzeptor (SA) wird in dieser Graphik gezeigt. Die Zahlen geben die Nukleotidpositionen an.
- (C): Das Translationsprodukt dieses Transkripts (s. (B)) ist das Protein E9^{E2C}, ein Fusionsprotein aus dem kleinen E9 Protein (schwarzes Rechteck), für das überlappend zum E1 Leserahmen kodiert wird, und dem C-Terminus und der Hinge von E2 (gestreiftes Rechteck).

heterologe Promotoren und synthetische Reporterkonstrukte (Stubenrauch et al., 2000; Stubenrauch et al., 2001). Um zu untersuchen, ob CRPV-E9^{E2C} ebenfalls Repressoreigenschaften besitzt, wurden Luziferasereporterassays durchgeführt. Dazu wurden SCC13 Zellen und CRL6502, eine epitheliale Zelllinie aus einem cottontail rabbit, sowie in einem Fall primäre humane Keratinozyten in 3,5 cm Zellkulturschalen mit 200ng verschiedener Reporterplasmide (Abb. 10) und 10 ng des Expressionsvektors E9^{E2C}-pSG5 oder als Vergleichswert 10 ng des leeren Expressionsvektors pSG5 mit Hilfe von Lipofektamin transfiziert. Gemeinsam ist den verwendeten Reporterplasmiden, dass sie mehrere E2-Bindestellen vor unterschiedlichen viralen Promotoren besitzen, die das Luziferasegen treiben. Eine Repression der Basalaktivität durch E9^{E2C} konnte bei jedem Reporterkonstrukt gezeigt werden, unabhängig davon, ob es sich um den homologen CRPV-Promotor P1 in seinem natürlichen Kontext oder den heterologen p97-Promotor von HPV 31 handelte, der für die Transkription der viralen Onkogene E6 und E7 zuständig ist. Auch minimale synthetische Reporterkonstrukte mit einem frühen SV40 oder einem adenoviralen Promotor wurden reprimiert. Nur das Ausmaß der Repression variierte je nach Zelllinie und Promotorkonstrukt zwischen 52,2% und 4,4% der entsprechenden basalen




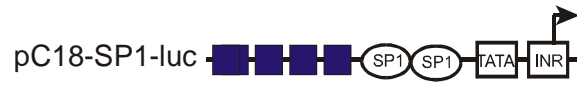
	Zelltyp	% Aktivität relativ zur Basalaktivität (+/- Standardabweichung)
 <p>pCRPV-NCR-luc</p>	SCC13	36,5 % (+/- 12,5)
	CRL 6502	20,5 % (+/- 13,9)
 <p>pGL31URR-luc</p>	NHK	4,4% +/- 1,1
 <p>p6xE2Bs-luc</p>	SCC13	52,2% (+/-23,6)
	CRL 6502	35 % (+/- 10,5)
 <p>pC18-SP1-luc</p>	SCC13	28% (+/-8,9)
	CRL6502	5,7% (+/-2,1)

Abb. 10: Repression verschiedener Reporterkonstrukte durch E9^ΔE2C in Luziferaseassays

SCC13, CRL6502 Zellen oder Normale Humane Keratinozyten (NHK) wurden mit je 200 ng eines Reporterplasmids transfiziert. Diesen Reporterplasmiden ist das Vorhandensein mehrerer E2-Bindestellen (schwarze Quadrate) vor verschiedenen viralen Promotoren (Pfeil), die das Luziferasegen treiben, gemeinsam. Die Luziferaseaktivität nach Kotransfektion mit 10 ng des Expressionsvektors E9^ΔE2C-pSG5 wird im Verhältnis zur Luziferaseaktivität nach Kotransfektion mit 10 ng des leeren Expressionsvektors pSG5 angegeben. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal in Doppelbestimmungen durchgeführt.

Promotoraktivität (Abb. 10). Jeder Luziferaseassay wurde mindestens dreimal in Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.2.3 Bedeutung des E9-Teils von E9^ΔE2C bei der Repression eines Promotorkonstrukts

Um nachzuweisen, dass der E9-Teil von CRPV-E9^ΔE2C, der für 10 Aminosäuren kodiert, eine essentielle Rolle bei der Repression spielt und nicht ein verkürztes E2C-Protein alleine dafür ausreichend ist, wurde eine Deletionsmutante konstruiert, bei der die Aminosäuren 3 bis 10 von E9 deletiert wurden und Lysin 2 gegen Alanin ausgetauscht wurde, da Alanin hinter dem Startkodon die Stabilität eines Proteins erhöht. Diese Mutante E9K2A(d3-10)^ΔE2C-pSG5 besteht also abgesehen von Methionin und Alanin nur noch aus dem E2C-Teil von E9^ΔE2C. In mehreren Luziferasereporterassays konnte gezeigt werden,

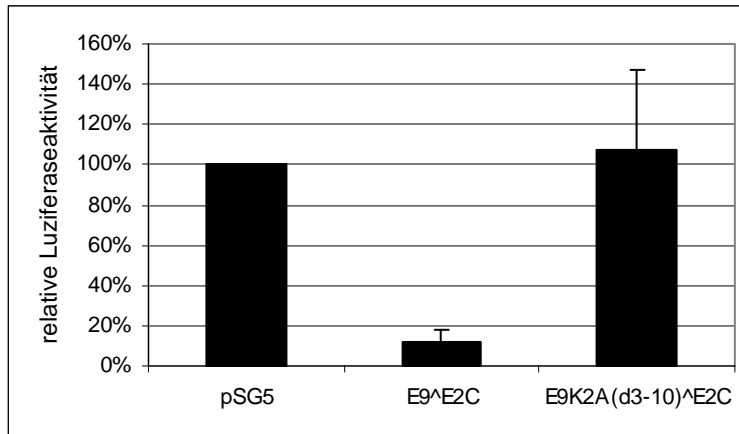


Abb. 11: Effekt einer E9-Deletionsmutante auf ein Reporterkonstrukt in Luziferaseassays
 CRL6502-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt pC18-SP1-luc (s. Abb. 10) und dem Expressionsvektor für die E9-Deletionsmutante E9K2A(d3-10)^{E2C} oder dem für Wildtyp-E9^{E2C} oder dem für den leeren Vektor pSG5 transfiziert. Die Luziferaseaktivitäten werden im Verhältnis zu der Aktivität in Proteinextrakten aus pSG5 transfizierten Zellen angegeben. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung aus vier Experimenten mit Doppelbestimmungen wider.

dass 10 ng dieser Deletionsmutante nicht mehr in der Lage sind, 200 ng des minimalen Promotorkonstrukts pC18-Sp1-luc (s. Abb. 10) in CRL6502 Zellen zu reprimieren. Im Gegensatz dazu verursachten 10 ng des Wildtyp-E9^{E2C}-pSG5 eine sehr starke Repression (Abb. 11). Der E9 Teil von E9^{E2C} ist also für die Repressoreigenschaft essentiell.

3.2.4 Wirkung von CRPV-E9^{E2C} auf die Transaktivierungsaktivität von E2

Um zu untersuchen, welchen Einfluß CRPV-E9^{E2C} auf die Transaktivierungsaktivität von CRPV-E2 hat, wurden SCC13 Zellen in 3,5 cm Zellkulturschalen mit 200 ng des synthetischen Reporterplasmids p6xE2BS-luc (s. Abb. 10), je 10 ng des CRPV-E2-pSG5 Expressionsvektors und steigenden Mengen (0, 3, 10 oder 30 ng) des CRPV-E9^{E2C}-pSG5 Expressionsvektors kotransfiziert. Fünfmal wiederholte Luziferaseassays mit Doppelbestimmungen zeigten, daß E9^{E2C}-pSG5 konzentrationsabhängig die transaktivierende Wirkung von E2-pSG5 inhibiert (Abb. 12).

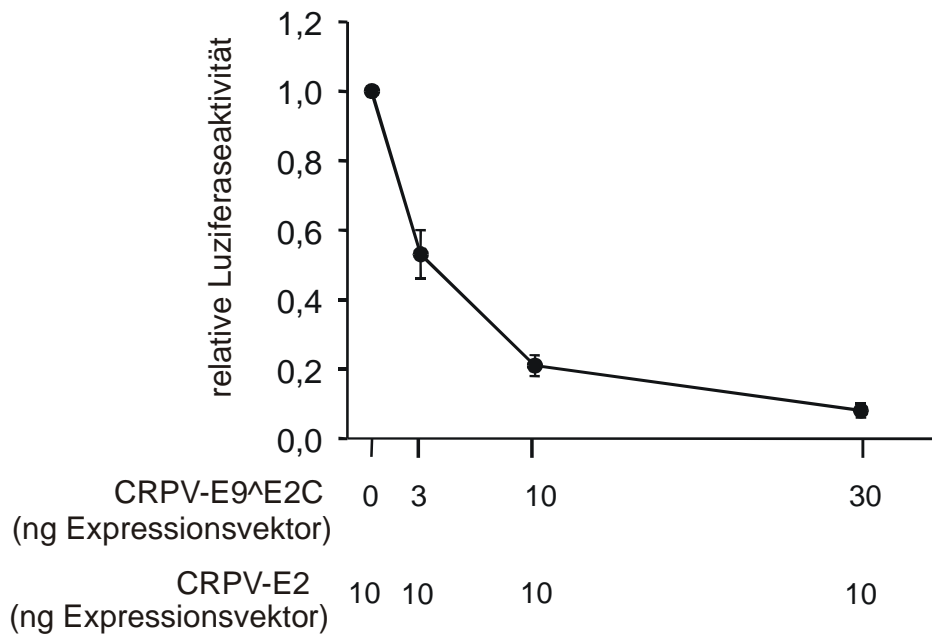


Abb. 12: Hemmung der E2-vermittelten Transaktivierung durch CRPV-E9^{E2C} in Luziferaseassays

SCC13 Zellen wurden mit dem Reporterplasmid p6xE2BS-luc (s. Abb. 10), einer konstanten Menge des Expressionsvektors für CRPV-E2 und ansteigenden Mengen des Expressionsvektors für E9^{E2C} kotransfiziert. Die Luziferaseaktivität in den Proteinextrakten aus Zellen ohne E9^{E2C}-pSG5 wurde gleich 1 gesetzt und alle weiteren Luziferaseaktivitäten dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

3.2.5 Wirkung von E9^{E2C} auf die E1- und E2-abhängige Replikation des CRPV-Replikationsursprungs

Neben der reprimierenden Wirkung von CRPV-E9^{E2C} auf die E2-vermittelte Transaktivierung wurde auch der Einfluß auf eine weitere E2 Funktion, die Stimulierung der Replikation, untersucht. Dazu wurde ein transienter Replikationsassay durchgeführt, bei dem SCC13 Zellen in 6 cm Zellkulturschalen mit 500 ng CRPV-NCR-pGL3, das die komplette nicht-kodierende Region von CRPV inklusive des Replikationsursprungs beinhaltet, zusammen mit Expressionsvektoren für CRPV-E1 (E1-pSG5) (1 µg) und für CRPV-E2 (E2-pSG5) (200 ng) und steigenden Mengen (0, 50, 200 oder 500 ng) des Expressionsvektors E9^{E2C}-pSG5 kotransfiziert wurden. Extrachromosomale DNA wurde 72 h nach der Transfektion isoliert, Spaltung mit dem Restriktionsenzym DpnI ermöglichte eine Unterscheidung von zellulär replizierter DNA gegenüber transfizierter DNA. Nach Linearisierung mit HpaI wurden die

niedrig-molekularen DNAs elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe eines Southern Blots wurde die Menge an replizierter NCR-DNA ermittelt. Als Sonde diente durchgehend mit ^{32}P markierte HpaI-linearisierte CRPV-NCR-pGL3-DNA, von der 10×10^6 cpm eingesetzt wurden. Aus Abb. 13 geht hervor, dass Zugabe von E9 \wedge E2C-pSG5 konzentrationsabhängig zu einer Abnahme der Replikationseffizienz führte.

E9 \wedge E2C entspricht also sowohl strukturell als auch nach den *in vitro* Experimenten funktionell dem Äquivalent E8 \wedge E2C von BPV 1, HPV 11, 16, 31 und 33 (Bouvard et al., 1994; Choe et al., 1989; Doorbar et al., 1990; Liu et al., 1995; Rotenberg et al., 1989; Snijders et al., 1992; Stubenrauch et al., 2000).

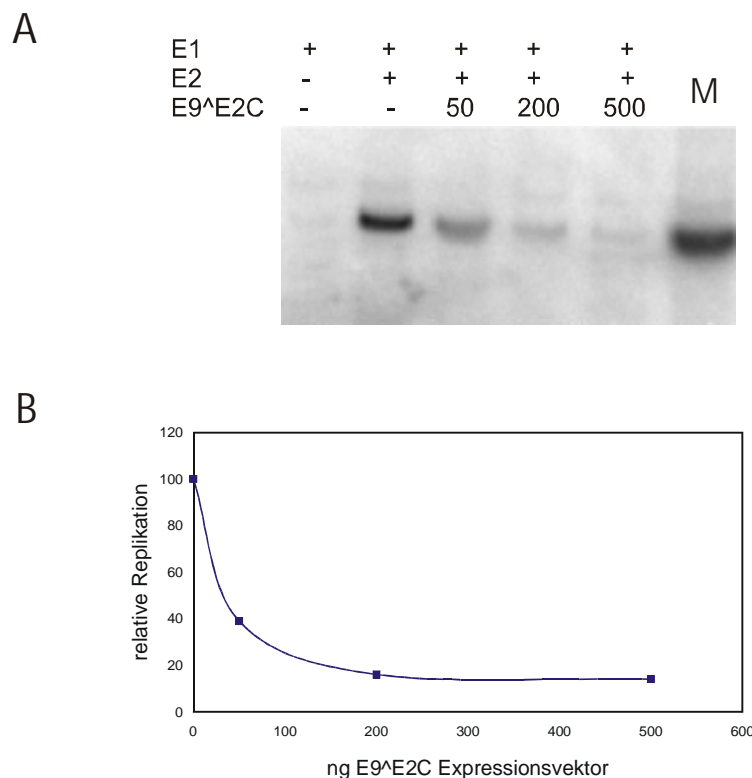


Abb. 13: Hemmung der E2-abhängigen Replikation des CRPV Replikations-ursprungs durch CRPV-E9 \wedge E2C in transienten Replikationsassays

- (A) SCC13 Zellen wurden mit dem Replikationsursprungsreporterplasmid CRPV-NCR-pGL3 und mit Expressionsvektoren für CRPV-E1-pSG5 (E1), CRPV-E2-pSG5 (E2) und unterschiedlichen Mengen (angegeben in ng) an E9 \wedge E2C-pSG5 (E9 \wedge E2C) transfiziert. Niedrig-molekulare DNA wurde 72h nach Transfektion isoliert und nach DpnI- und HpaI-Verdau mittels Southern-Blot-Hybridisierung analysiert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Als Größenmarker für die DpnI-resistente CRPV- NCR-pGL3-DNA diente HpaI-linearisiertes CRPV-NCR-pGL3-Plasmid (Spur M).
- (B) Quantitative Auswertung des Southernblots. Die relative Replikation gibt die Menge an repliziertem Ursprungsplasmid in Prozent an, wobei die Menge aus Zellen ohne Zugabe von E9 \wedge E2C-pSG5 gleich 100% gesetzt wurde.

3.3 Überprüfung der Bedeutung der *in vitro* Daten im Tiermodell

3.3.1 Einfluß der Transaktivierungsfunktion von CRPV-E2 auf die Tumorinduktion *in vivo*

Die *in vitro*-Ergebnisse zeigten, dass die hochkonservierten Aminosäuren 37 und 73 von CRPV-E2 eine Bedeutung bei der Transaktivierungsfunktion von CRPV-E2 haben. Welche Rolle die Transaktivierungsdomäne allerdings bei Tumorinduktion und –progression *in vivo* spielt, ist noch nicht bekannt. Deshalb wurden die transaktivierungsdefizienten Mutanten R37A, I73L und I73A und die transaktivierungskompetente Mutante R37K im Tiermodell Hauskaninchen untersucht.

3.3.1.1 Einführung von Mutationen in E2 im gesamtgenomischen Kontext von CRPV

Die Mutation von Arginin 37 zu Lysin oder Alanin und von Isoleucin 73 zu Leucin oder Alanin in der Transaktivierungsdomäne von CRPV-E2 wurde in den gesamtgenomischen Kontext von CRPV-pLAII eingeführt. Dies erfolgte mittels Mutagenese-PCR mit den entsprechenden Mutationsprimern, anschließender Restriktionsspaltung und Rückklonierung in CRPV-pLAII. Die Fehlerfreiheit der PCR-amplifizierten Fragmente wurde durch Sequenzierung kontrolliert. Die entstandenen gesamtgenomischen Mutanten wurden E2-R37K-CRPV-pLAII, E2-R37A-CRPV-pLAII, E2-I73L-CRPV-pLAII und E2-I73A-CRPV-pLAII genannt. Das Wildtyp-Gesamtgenom und das E2-I73A-CRPV-pLAII Gesamtgenom wurden vollständig sequenziert und miteinander verglichen. Außer der eingeführten Mutation lag kein weiterer Basenaustausch vor.

3.3.1.2 Tumorinduktion in Kaninchen durch die mutierten CRPV-Genome

Gold-Präzipitate mit den gesamtgenomischen Mutanten-DNAs E2-I73L-CRPV-pLAI, E2-I73A-CRPV-pLAI, E2-R37K-CRPV-pLAI und E2-R37A-CRPV-pLAI sowie mit Wildtyp-CRPV-pLAI wurden mittels einer „Helios-gene-gun“ in die Haut von New Zealand White Kaninchen eingebracht. Dazu wurde jeder Kaninchenrücken in vier Segmente aufgeteilt, jedes Segment enthielt acht Stellen, die mit Wildtyp-CRPV-pLAI-DNA oder einer Mutanten-CRPV-pLAI-DNA injiziert wurden (Abb. 4). Die Untersuchungen konzentrierten sich in einem ersten Experiment auf die I73A Mutante, da diese sich am stärksten transaktivierungsdefizient in der Zellkultur präsentierte. Es wurden je 2 Segmente auf 4 Kaninchen mit Wildtyp-CRPV-pLAI und E2-I73A-CRPV-pLAI injiziert. 10 µg DNA wurden in jede Injektionsstelle mit der „Helios-gene-gun“ mittels Heliumdruckgas transferiert. Nach sechs Wochen entstanden an 85% der 56 mit Wildtyp injizierten Stellen Papillome, während im gleichen Zeitraum kein einziges Papillom sich an einer mit E2-I73A-CRPV-pLAI injizierten Stelle entwickelte. Erst nach zwölf Wochen war die Entstehung eines einzelnen kleinen Papilloms sichtbar und nach weiteren zwölf Wochen entwickelte sich ein weiteres. Somit genügte der Austausch dieser einen Aminosäure im fast 8 kbp großen CRPV-Genom, um die Tumorentstehung fast vollständig auszuschalten. Auch das Größenwachstum dieser beiden kleinen verspätet entstandenen Tumoren ist deutlich verringert. Beide wurden 6 Monate nach der Injektion entfernt. Gesamtzelluläre DNA wurde aus ihnen isoliert und das Vorliegen der Mutation I73A in diesen Papillomen wurde mittels Sequenzierung eines PCR-amplifizierten Bereichs bestätigt. Ein zweites Experiment, bei dem auf 5 Kaninchen je 40 Stellen mit je 7 µg der I73A-Mutante oder Wildtyp-DNA injiziert wurden, bestätigte das vorherige Ergebnis, da selbst nach zwölf Wochen die I73A-Mutante keine Papillome induziert hatte, während an allen mit Wildtyp injizierten Stellen ein Papillom entstanden war. Um auch die Auswirkung der anderen E2-Mutanten auf die Tumorinduktionsrate zu untersuchen, wurden in einem dritten Experiment auf vier weiteren Kaninchen zusätzlich zu Wildtyp-



Abb. 14: Papillomentstehung im Kaninchen nach Injektion mit CRPV-DNA

Fotografie eines Kaninchenrückens acht Wochen nach der Injektion mit WT-CRPV-pLAI (WT), E2-R37K-CRPV-pLAI (R37K), E2-R37A-CRPV-pLAI (R37A) oder E2-I73L-CRPV-pLAI (I73L). Die Injektion der DNA erfolgte mit Hilfe der „Helios-gene-gun“. Papillom-entstehung war nur an WT-injizierten Stellen sichtbar.

Tab.2.: Tumorentstehung und –größenentwicklung nach Injektion mit CRPV-Viruspartikeln, CRPV-Wildtyp-DNA oder CRPV-E2-Mutanten-DNA

Zeit nach der Injektion	Experiment	injiziert mit	Anzahl an Kaninchen	Anzahl an Tumoren (Anzahl an Inj.Stellen)	%	maximaler durchschnittl. Ausdehnung (mm)
6 Wochen	Nr. 1	Virusstock	4	12 (16)	75%	n.d. ^a
		Wildtyp-DNA	4	48 (56)	85%	n.d. ^a
		I73Amut-DNA	4	0 (56)	0%	n.d. ^a
	Nr. 2	Wildtyp-DNA	5	40 (40)	100%	n.d. ^a
		I73Amut-DNA	5	0 (40)	0%	n.d. ^a
	Nr. 3	Wildtyp-DNA	4	32 (32)	100%	n.d. ^a
R37Kmut-DNA	4	0 (32)	0%	n.d. ^a		
I73Lmut-DNA	4	0 (32)	0%	n.d. ^a		
R37Amut-DNA	4	0 (32)	0%	n.d. ^a		
12 Wochen	Nr. 1	Virusstock	4	14 (16)	88%	14
		Wildtyp-DNA	4	42 (56)	75%	23
		I73Amut-DNA	4	1 (56)	1.8%	2
	Nr. 2	Wildtyp-DNA	5	40 (40)	100%	31
I73Amut-DNA	5	0 (40)	0%	0		
24 Wochen	Nr. 1	Virusstock	4	12 (16)	75%	konfluent ^b
		Wildtyp-DNA	4	42 (56)	75%	konfluent ^b
		I73Amut-DNA	4	2 (56)	3,6%	3

^a n.d. = nicht bestimmt

^b die Tumorgöße konnte nicht mehr bestimmt werden, da man die einzelnen Tumore nicht mehr voneinander trennen konnte

CRPV-pLAI je ein Segment mit E2-R37K-CRPV-pLAI, E2-R37A-CRPV-pLAI und E2-I73L-CRPV-pLAI injiziert. Jede Injektionsstelle erhielt wiederum 7 µg DNA. An keiner der je 32 mit Mutanten-DNA injizierten Stellen entwickelte sich innerhalb von 8 Wochen ein Papillom, während 100% der mit Wildtyp-DNA

injizierten Stellen, eine Tumorentstehung vorweisen konnten. Die zusammengefaßten Ergebnisse werden in Tab. 2 dargestellt, Abb. 14 verdeutlicht das Injektionsschema und zeigt exemplarisch ein Kaninchen acht Wochen nach der Injektion. Alle Mutanten der Transaktivierungsdomäne von CRPV-E2 zeigten *in vivo* keine Tumorentwicklung.

3.3.2 Bedeutung von CRPV-E9^{E2C} *in vivo*

Die *in vitro* Daten belegen, dass es sich bei CRPV-E9^{E2C} um einen Repressor der Transkription von verschiedenen viralen Promotoren und der E2-abhängigen Replikation des CRPV-Replikationsursprungs handelt. Die Bedeutung dieser Effekte für die Tumorentstehung und -eigenschaften *in vivo* ist aber unbekannt. Deshalb wurden gesamtgenomische CRPV-E9-Mutanten im Tiermodell Hauskaninchen untersucht.

3.3.2.1 Einführung von Mutationen in E9 im gesamtgenomischen Kontext von CRPV

Zum einen wurde das vermutliche E9 Startkodon (Methionin) gegen acg (Threonin) durch Mutagenese-PCR ausgetauscht. Dieser Austausch hat keine Auswirkung auf das im überlappenden Leserahmen liegende E1. Diese gesamtgenomische E9-Mutante wurde E9atgmut-CRPV-pLAI1 genannt. Desweiteren wurde eine zweite E9-Mutante, E9stop-CRPV-pLAI1, konstruiert, bei der das kodierende Triplet für Tyrosin 10 von E9 gegen das Stopkodon tag im gesamtgenomischen Kontext mittels Mutagenese-PCR ausgetauscht wurde (Abb. 15). Dieser Basenaustausch führte im E1-Protein zu einem Austausch von Glutamin gegen Glutaminsäure. Ob zusätzlich eine Zerstörung des Spleißdonors durch diese Mutation vorlag, musste untersucht werden. Alle PCR-amplifizierten Bereiche wurden sequenziert und mit der Ausgangssequenz verglichen.

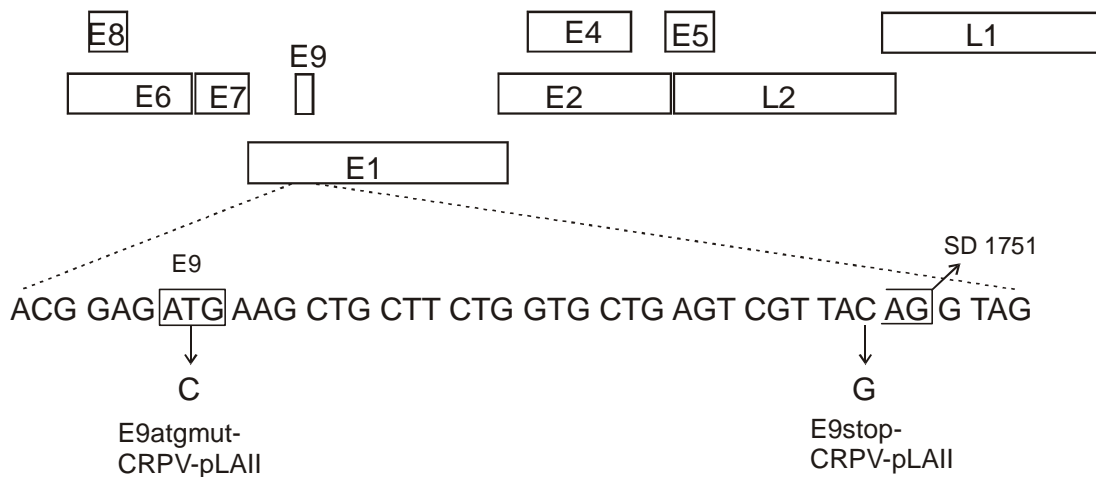


Abb. 15: In E9 eingeführte Mutationen im Kontext des gesamten CRPV-Genoms

Die Graphik zeigt das CRPV-Gesamtgenom mit den offenen Leserahmen (Rechtecke), darunter ist die Nukleotidsequenz des CRPV-E9-Gens aufgeführt. Das einzige Startkodon innerhalb von E9 ist umrahmt, der Spleißdonor wird durch den offenen Kasten angezeigt. Die mutierten Nukleotide, die zu einer Zerstörung des atg Kodons in der Mutante E9atgmut-CRPV-pLAI oder zur Einführung eines Stopkodons in der Mutante E9stop-CRPV-pLAI führen, sind unterhalb der Pfeile angegeben.

3.3.2.2 Tumorinduktion in Kaninchen durch die gesamtgenomischen E9-Mutanten

Sechs Kaninchen wurde an insgesamt 77 Stellen je 10 µg Wildtyp-CRPV-pLAI und an 77 Stellen je 10 µg E9atgmut-CRPV-pLAI mit Hilfe der „Helios-gene-gun“ injiziert. Sechs Monate später waren an 61% der mit Wildtyp-DNA injizierten Stellen, ebenso wie an 61% der mit E9atgmut-CRPV-pLAI injizierten Stellen Papillome entstanden, die sich im Durchschnitt nicht in der maximalen Ausdehnung pro Papillom unterschieden. Es war also weder ein Unterschied in der Tumorentstehung noch im Tumorwachstum erkennbar (Tab. 3). Wie histologisch nachgewiesen wurde, sind sowohl durch Wildtyp als auch durch die Mutante induzierte Tumoren in der Lage, zu Karzinomen zu progredieren. Fünf zusätzlichen Kaninchen wurde an insgesamt je 40 Stellen je 7 µg Wildtyp-CRPV-pLAI und E9stop-CRPV-pLAI injiziert. Weitere 40 Stellen wurden mit einer dritten gesamtgenomischen Mutante injiziert, an Hand derer untersucht wurde, ob der knock-out des Repressorproteins E9^{E2C} eine Auswirkung auf den fast vollständigen Verlust der Tumorentstehung nach Ausschalten der

Transaktivierungsfunktion von CRPV-E2 hat (siehe 3.3.1.2.). Dazu wurde die E9atgmut-Mutation mit der E2-I73A-Mutation im CRPV-Gesamtgenom kombiniert. Diese Doppelmutante wurde E9atgmut+E2-I73A-CRPV-pLAII genannt. Innerhalb der nächsten 3 Monate entwickelten sich an 100% der Wildtyp und an 98% der E9stop-CRPV-pLAII injizierten Stellen Papillome mit einer im Durchschnitt vergleichbaren maximalen Ausdehnung pro Papillom (Tab. 3). Auch diese Mutation in E9 hatte also keinen Einfluß auf die Tumorentstehung. An keiner der mit der Doppelmutante injizierten Stellen entwickelte sich ein Papillom, die E9-Mutante ist also nicht in der Lage, den Verlust der Papillominduktion nach Mutation der transaktivierungsessentiellen Aminosäure 73 in CRPV-E2 zu beeinflussen. Biopsien der entstandenen Tumoren wurden drei, sechs, neun und zwölf Monate nach der Injektion entnommen und deren DNA und RNA charakterisiert.

Tab.3: Tumorentstehung und –charakterisierung in mit CRPV-Wildtyp-DNA oder CRPV-E9 Mutanten-DNA injizierten Kaninchen

	injiziert mit	Anzahl an Papillomen/ Anzahl an Injektionsstellen	durchschnittl. maximale Ausdehnung	durchschnittl. CRPV-Kopienzahl/ Zelle	durchschnittl. CRPV-Transkriptzahl/ beta-Aktin
Kaninchen 1-6	CRPV-E9atgmut-pLAII	47/ 77 (61%)	0,74 cm	15,7 (+/- 13,2) ^a	4,8 (+/- 1,7) ^a
	Wildtyp CRPV-pLAII	47/ 77 (61%)	0,88 cm	22,7 (+/- 16,6) ^a	5,8 (+/- 1,4) ^a
Kaninchen 7-11	CRPV-E9stop-pLAII	39/ 40 (98%)	2,7 cm	18,0 (+/- 7,1) ^a	5,0 (+/- 0,8) ^a
	Wildtyp CRPV-pLAII	40/ 40 (100%)	3,1 cm	24,4 (+/- 7,6) ^a	3,8 (+/- 0,7) ^a

^a = Standardabweichung

3.3.2.3 Kopienzahl und physikalischer Status der DNA in CRPV-induzierten Tumoren

Aus den entnommenen Tumoren wurde Gesamt-DNA isoliert. Das Vorliegen der jeweiligen Mutation in der entsprechenden Biopsie konnte durch Sequenzierung eines mittels PCR amplifizierten Bereichs nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob E9 einen Einfluß auf die CRPV-Kopienzahl in den Tumoren hat, wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Ein Fragment innerhalb von CRPV-E7 wurde mit Hilfe spezifischer fluoreszenzmarkierter Hybridisierungssonden und den spezifischen Primern pE7for und pE7rev im LightCycler amplifiziert und so die absolute CRPV-Kopienzahl bestimmt. Abgeglichen wurde diese gegen die alpha-Tubulin Kopienzahl, die mit den spezifischen Primern p α -Tubulin-for und p α -Tubulin-rev und SYBRGreen in den selben DNA-Verdünnungen, in denen auch CRPV-E7 bestimmt wurde, gemessen wurde. In Tab. 3 wird die CRPV-Kopienzahl pro Zelle angegeben. Es war kein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp und einer der beiden E9 Mutanten zu erkennen. Der physikalische Status der DNA wurde mittels Southern Blot bestimmt, je 10 μ g der isolierten DNA wurden entweder mit dem Restriktionsenzym XhoI oder mit EcoRI gespalten. Während es sich bei XhoI um ein Restriktionsenzym handelt, das nicht in CRPV-pLAII schneidet, schneidet EcoRI einmal in CRPV und einmal im Vektor pLAII. Die gespaltenen DNAs wurden über ein Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend mit 10×10^6 cpm einer durchgehend 32 P-markierten Sonde hybridisiert. Als Sonde diente vektorlose CRPV-DNA. Das Schnittmuster der DNA aus E9atgmut-CRPV-pLAII und E9stop-CRPV-pLAII induzierten Papillomen war jeweils dem aus Wildtyp-CRPV-pLAII induzierten Papillomen sehr ähnlich. Es gab Hinweise auf integrierte DNA und die Anwesenheit von Banden in Höhe der offenen Ringform des Virus in den XhoI geschnittenen Bahnen deuten auf episomal vorliegende DNA (Abb. 16).

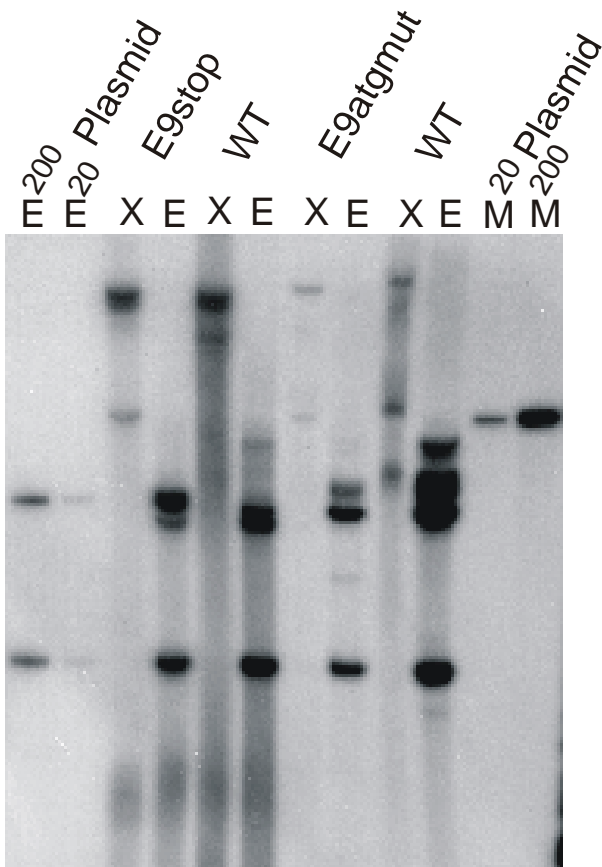


Abb. 16: Southern-Blot-Analyse von DNA isoliert aus Papillomen, die durch WT-CRPV-pLAII-DNA (WT) oder E9-Mutanten-CRPV-pLAII-DNA (E9stop und E9atgmut) induziert wurden

Je 10 µg jeder DNA wurden mit XhoI (X), einem nicht in CRPV-pLAII schneidenden Restriktionsenzym, oder EcoRI (E), einem zweimal in CRPV-pLAII schneidenden Restriktionsenzym, gespalten. Hybridisierung erfolgte mit Hilfe von ³²P-markierter linearisierter CRPV-DNA. Als Größenmarker für ungeschnittene CRPV-pLAII-DNA dienten 20 µg oder 200 µg mit dem Restriktionsenzym MluI (M) linearisiertes CRPV-pLAII-Plasmid. Für EcoRI geschnittene CRPV-pLAII-DNA dienten 20 µg oder 200 µg EcoRI geschnittenes Plasmid als Größenmarker.

3.3.2.4 Präsenz des Spleißtranskripts und Transkriptmengenvergleich in RNA aus CRPV-induzierten Tumoren

Aus den entnommenen Biopsien wurden Gesamt-RNAs isoliert. In den RNAs isoliert aus Wildtyp-CRPV-pLAII- und E9atgmut-CRPV-pLAII- induzierten Papillomen konnte das Spleißtranskript für E9^{E2C} mittels RT-PCR und den Primern pE9atg und p3883 nachgewiesen werden, während es in den RNAs aus E9stop-CRPV-pLAII-induzierten Tumoren fehlte (Abb. 17). Diese Mutation fügte somit nicht nur ein Stopkodon in E9 ein, sondern verhinderte zusätzlich auch den Spleiß des Transkripts. Das gesamte Transkript ist also für die Tumorentstehung entbehrlich. Die CRPV-Gesamttranskriptmengen in den isolierten RNAs wurden nach DNaseI- Spaltung mit anschließender cDNA-Synthese mittels quantitativer

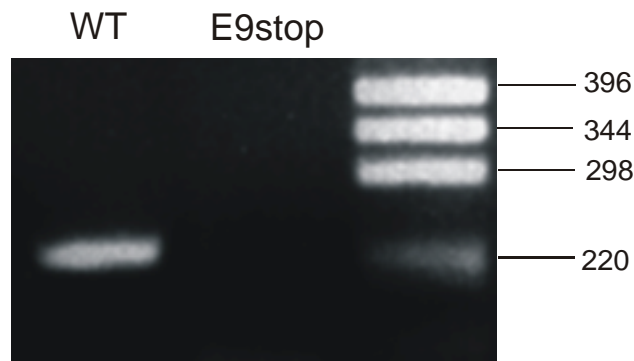


Abb.17: RT-PCR auf das E9^ΔE2C Transkript

RNAs isoliert aus E9stop-CRPV-pLAII- (E9stop) und Wildtyp-CRPV-pLAII- (WT) induzierten Papillomen wurden in einer RT-PCR mit Ready-To-Go™ RT-PCR beads und den Primern E9atg und p3883 als Matrize eingesetzt. Die amplifizierten Fragmente wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Größen des Molekulargewichtsstandards sind rechts in bp angegeben.

PCR und SYBRGreen im LightCycler bestimmt. Dazu wurden zwei spezifische Primer benutzt, in-E4-for und in-E4-rev, die im E4-Gen unterhalb des Spleißakzeptors liegen und alle bekannten frühen Transkripte von CRPV detektieren können. Die absolute Transkriptzahl wurde anschließend gegen das „House-keeping-Gen“ beta-Aktin abgeglichen, das im LightCycler in den selben cDNA-Verdünnungen mittels SYBRGreen gemessen wurde. Tab. 3 zeigt, dass kein deutlicher Unterschied in der Transkriptzahl zwischen Wildtyp- und E9Mutanten-RNA aus Biopsien zu erkennen war. Um festzustellen, ob ein einzelnes CRPV-Transkript besonders hochreguliert ist, wurde ein exemplarischer Northern-Blot mit je 600ng poly-A+ selektionierter mRNA aus E9atgmut-CRPV-pLAII- und Wildtyp-CRPV-pLAII-induzierten Papillomen durchgeführt. 10×10^6 cpm einer durchgehend mit ^{32}P -markierten CRPV-DNA wurden als Sonde benutzt. In der Transkriptverteilung war in diesem Northern-Blot kein offensichtlicher Unterschied zu erkennen (Abb. 18).

Die Funktion von CRPV-E9^ΔE2C im viralen Replikationszyklus von CRPV *in vivo* ist somit noch nicht geklärt.

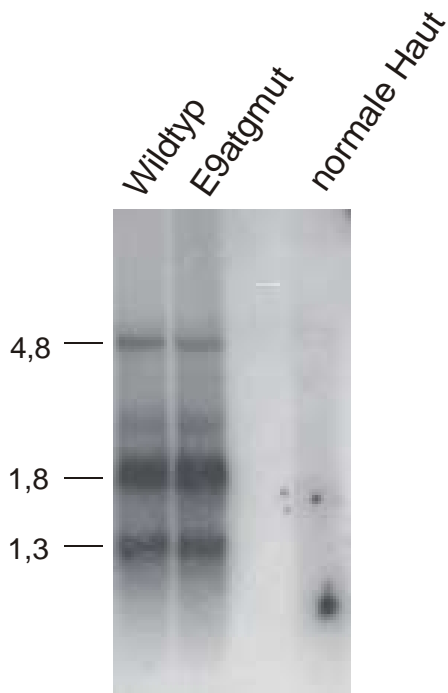


Abb. 18: Northern-Blot-Analyse von polyA⁺mRNA isoliert aus Papillomen induziert durch WT-CRPV-pLAII oder E9atgmut-CRPV-pLAII

Je 600ng polyA⁺mRNA wurden pro Bahn aufgetragen. Nach Transfer auf eine Nylon-Membran erfolgte die Hybridisierung mit Hilfe von ³²P-markierter linearisierter CRPV-DNA. Als Negativkontrolle diente polyA⁺mRNA isoliert aus normaler Kaninchenhaut (normale Haut). Die Größen des Molekulargewichtsstandards sind links in kbp angegeben.

3.4 Behandlung von CRPV-induzierten Papillomen mit PolyphenonTM E aus Extrakt von grünem Tee

Es ist bekannt, dass Polyphenole anti-tumorigene Eigenschaften besitzen und wirksam gegen chemisch oder durch UV-B-Strahlung induzierte Hauttumoren sind (Mukhtar et al., 1994). Deshalb war es naheliegend, die Wirksamkeit von Polyphenolen auf papillomvirusinduzierte Tumoren zu untersuchen, insbesondere da erste Vorversuche mit PolyphenonTM E, einer Polyphenolformulierung, gegen HPV-induzierte benigne genitale Warzen vielversprechend verliefen (klinische Phase III – Studie). Die Behandlung CRPV-induzierter Hauttumoren in Hauskaninchen mit PolphenonTM E soll als ein *in vivo*-Modell für mögliche pharmazeutische Anwendungen in der Humanmedizin dienen.

3.4.1 Infektion der Kaninchen mit CRPV und Behandlungsschema

Neun Hauskaninchen wurden mit CRPV-Viruspartikeln infiziert, die mit Hilfe eines Tätowiergeräts jeweils an 32 Stellen, verteilt auf vier Segmente, in die Kaninchenhaut eingebracht wurden (Abb. 4). Nach fünf Wochen war die Papillomentstehung größtenteils abgeschlossen und die Behandlung der

entstandenen Papillome wurde begonnen. Später noch auftretende Papillome wurden mitbehandelt, sobald sie palpabel waren. Das Behandlungsschema wird in Tab. 4 dargestellt. Drei der Kaninchen (Nr. 1, 2, 3) wurden mit Polyphenon™ E-Creme behandelt, wobei ein Segment bei zwei dieser drei Kaninchen (Nr. 1, 2) mit dem Placebo der Creme behandelt wurde, um die Wirksamkeit des Wirkstoffs innerhalb eines individuellen Kaninchens beurteilen zu können. Um auch im Falle eines systemischen Effekts des Wirkstoffs die Wirksamkeit von

Tab.4: Behandlungsschema der Kaninchen mit Polyphenon™ E und Anzahl der entstandenen Papillomen

Kaninchen Nr.	Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	Anzahl Papillome	
					5 Wochen post inf.	9 Wochen post inf.
1	Creme	Placebo- Creme	Creme	Creme	31	31
2	Creme	Creme	Creme	Placebo- Creme	31	31
3	Creme	Creme	Creme	Creme	9	14
4	Placebo- Creme	Placebo- Creme	Placebo- Creme	Placebo- Creme	25	25
5	Placebo- Creme	Placebo- Creme	Placebo- Creme	Placebo- Creme	30	30
6	Salbe	Salbe	Placebo- Salbe	Salbe	31	31
7	Salbe	Salbe	Salbe	Salbe	14	24
8	Placebo- Salbe	Placebo- Salbe	Placebo- Salbe	Placebo- Salbe	32	32
9	Placebo- Salbe	Placebo- Salbe	Placebo- Salbe	Placebo- Salbe	19	19

Polyphenon™ E beurteilen zu können, wurden zwei weitere Kaninchen (Nr. 4, 5) nur mit Creme–Placebo behandelt. Beim Vorliegen eines systemischen Effekts des Polyphenon™ E würde in diesen nur Placebo-behandelten Tieren keine Veränderung der Größenentwicklung der Tumoren verglichen mit unbehandelten Tieren vorliegen, während innerhalb der Wirkstoff-behandelten Tiere ein Effekt sowohl auf Wirkstoff- als auch Placebo-behandelte Tumoren zu erwarten wäre. Zwei weitere Kaninchen (Nr. 6, 7) wurden mit Polyphenon™ E-Salbe behandelt, wobei wiederum ein Segment eines der Kaninchen (Nr. 6) mit dem entsprechenden Placebo, hier also Salben-Placebo, behandelt wurde. Die übrigen zwei Kaninchen (Nr. 8, 9) wurden nur mit Salben-Placebo behandelt (s. Tab. 4). Neben der Wirkung des Polyphenon™ E-Wirkstoffs auf das Tumorstadium sollten auch die Unterschiede in der Verträglichkeit und Wirksamkeit zweier unterschiedlicher Formulierungen untersucht werden – von Creme und Salbe. Einmal wöchentlich wurde die Größenentwicklung jedes Papilloms bestimmt, indem Länge und Breite mit der Schublehre ausgemessen wurden. Fotodokumentation fand mit einer Digitalkamera statt. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde an Parametern wie Allgemeinbefinden, Futteraufnahme, Kotabsatz und Verhalten während des Versuchszeitraums kontrolliert.

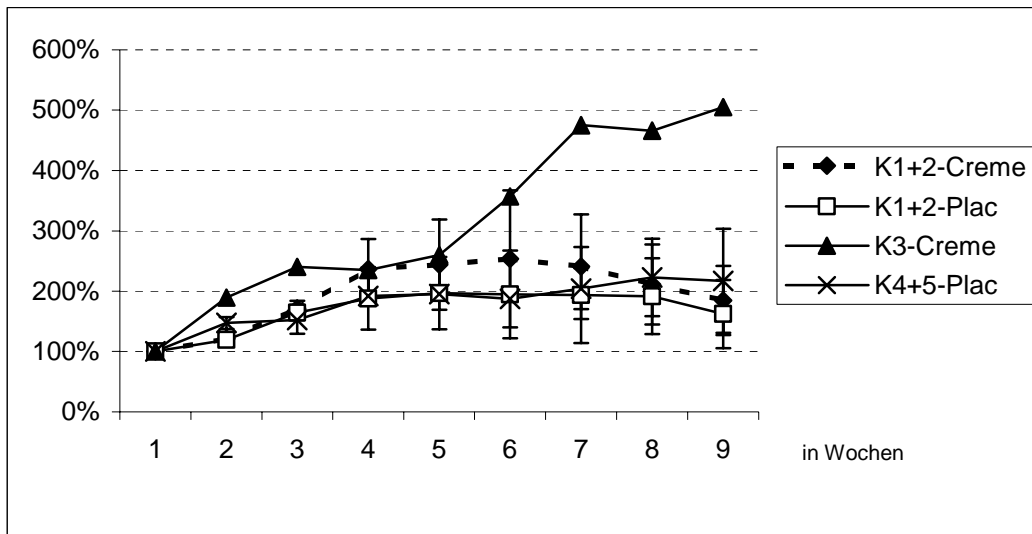
3.4.2 Behandlungserfolg durch Polyphenon™ E

Fünf Wochen nach der Infektion hatte sich bei sieben der neun Kaninchen die endgültige Anzahl an Papillomen entwickelt, wobei fünf Kaninchen (Nr. 1, 2, 5, 6, 8) eine sehr gute Tumorentstehungsrate von 30 oder mehr Papillomen hatten, die teilweise auch schon sehr groß – bis zu 1,8 cm x 1,2 cm- und relativ stark verhornt waren. Zwei weitere Kaninchen entwickelten 24 bzw. 19 Papillome (Nr. 4, 9). Die übrigen zwei Kaninchen (Nr. 3, 7) hatten nur sehr kleine (durchschnittliche Fläche pro Papillom: 0,2 cm² bzw. 0,27 cm² gegenüber bis zu 1,27 cm² durchschnittliche Fläche pro Papillom bei anderen Kaninchen), gering verhornte und wenige Papillome (9 bzw. 14) zu diesem Zeitpunkt ausgebildet. Die Anzahl steigerte sich innerhalb der nächsten vier Wochen um 5 bzw. 10

Papillome. Diese beiden Kaninchen wurden in die Gruppe der nur mit Wirkstoff ohne Placebo zu behandelnden Tiere eingeteilt. Tab. 4 gibt das Behandlungsschema und die Papillomanzahl wieder. Die Platzierung des Placebo-behandelten Segments wurde bei den verschiedenen Kaninchen variiert, um lokale Unterschiede ausschließen zu können. Ein Einfluß auf den Gesundheitszustand der Tiere war nicht zu erkennen, auch die lokale Verträglichkeit des Wirkstoffs war gut, sieht man davon ab, dass es bei mit Salbe behandelten Tieren zu einer unangenehmen Geruchsentwicklung kam, die vermutlich auf bakterielle Zersetzungs Vorgänge zurückgeführt werden kann. Gelegentlich wurde von einzelnen Tieren insbesondere die Creme abgeleckt, was keine gesundheitlichen Folgen hatte. In Abb. 19 A ist die wöchentliche Papillomgrößenentwicklung der mit PolyphenonTM E-Creme und Placebo-Creme behandelten Tiere aufgetragen. Dabei wird die jeweilige durchschnittliche Papillomfläche bei Beginn der Behandlung 100% gesetzt und die nachfolgende Größenveränderung dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Wirkstoff- und die Placebo-behandelten Segmente der Tiere 1 und 2 ebenso wie der Tiere 4 und 5 wurden jeweils zusammengefasst. Bei Tier 3 fand eine sehr starke relative Papillomgrößenentwicklung statt, die aber keine absoluten Größenabweichungen widerspiegelt, sondern auf die sehr kleinen Ausgangsgrößen zurückzuführen ist (s. Abb. 20 A). Vergleicht man das Tumorwachstum von PolyphenonTM E-Creme behandelten Papillomen mit dem von Placebo behandelten Papillomen, so konnte kein eindeutiger Unterschied festgestellt werden. Es fand keine Tumorregression statt, auch ein verlangsamtes Wachstum lag nicht vor. Ähnlich verhielt es sich bei den mit PolyphenonTM E-Salbe behandelten Tumoren, auch hier fand bei den Wirkstoff behandelten Papillomen keine Regression statt, das Größenwachstum war vergleichbar dem der Placebo-behandelten Tumoren. Kaninchen 7 verhielt sich wie Kaninchen 3 und auch hier lag keine in absoluten Werten große Tumorfläche vor, nur relativ zu der sehr niedrigen Ausgangsfläche (Abb. 19 B und 20 B). Nach 8 Wochen wurde die Behandlung eingestellt, und die weitere Tumorentwicklung beobachtet, sowie erneute Messungen 2 und 6 Monate nach Ende der Behandlung durchgeführt. Auch 2 Monate nach Ende der Behandlung war kein Unterschied im Wachstum zwischen Wirkstoff- und

Placebo-behandelten Tumoren feststellbar. Sechs Monate nach Ende der Behandlung war eine Größenbestimmung der Tumoren häufig nicht mehr möglich, da einzelne Tumoren sich nicht mehr voneinander trennen ließen und eine konfluente Fläche bildeten. Bei den messbaren Tumoren war kein Effekt durch die PolyphenonTM E Behandlung zu erkennen. Eine Erhöhung der Regressionsrate der CRPV-induzierten Papillome oder ein verringertes Größenwachstum der Tumore durch Behandlung mit PolyphenonTM E konnten in dieser Versuchsreihe somit nicht nachgewiesen werden.

(A) Prozentuale Tumorgößenentwicklung der mit Creme behandelten Tiere



(B) Prozentuale Tumorgößenentwicklung der mit Salbe behandelten Tiere

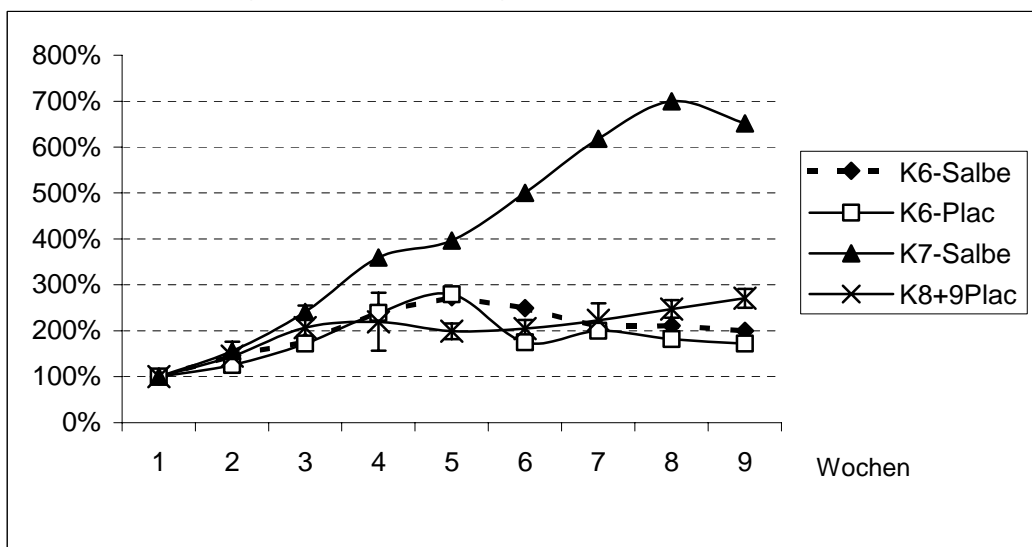


Abb. 19: Prozentuale Größenentwicklung der Papillome während der Behandlung mit Polyphenon™ E-Creme, Placebo-Creme, Polyphenon™ E-Salbe oder Placebo-Salbe

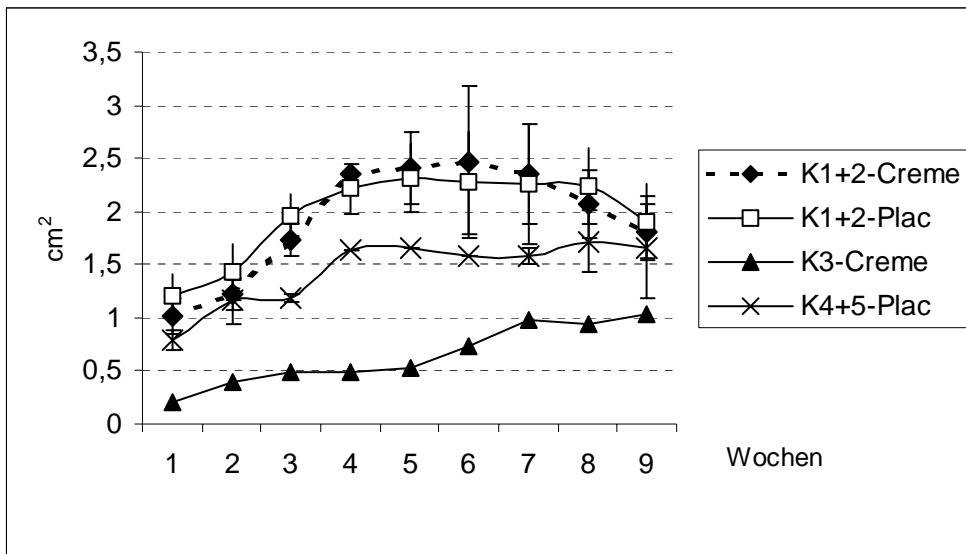
Einmal wöchentlich wurde die Größe jedes einzelnen Papilloms gemessen und die durchschnittliche Größe pro Tier und Behandlungsagens bestimmt. Die durchschnittliche Größe der Papillome bei Behandlungsbeginn (= Woche 1) wurde gleich 100% gesetzt.

(A) Die mit Polyphenon™ E-Creme behandelten Papillome von Kaninchen 1 und 2 (K1+2-Creme), ebenso wie deren mit Placebo behandelten Papillome (K1+2-Plac), und die mit Placebo-Creme behandelten Papillome von Kaninchen 4 und 5 (K4+5-Plac) wurden zusammengefaßt.

(B) Die mit Placebo-Salbe behandelten Papillome von Kaninchen 8 und 9 (K8+9-Plac) wurden ebenfalls zusammengefaßt.

Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

(A) absolute Tumorgößenentwicklung der mit Creme behandelten Tiere



(B) absolute Tumorgößenentwicklung der mit Salbe behandelten Tiere

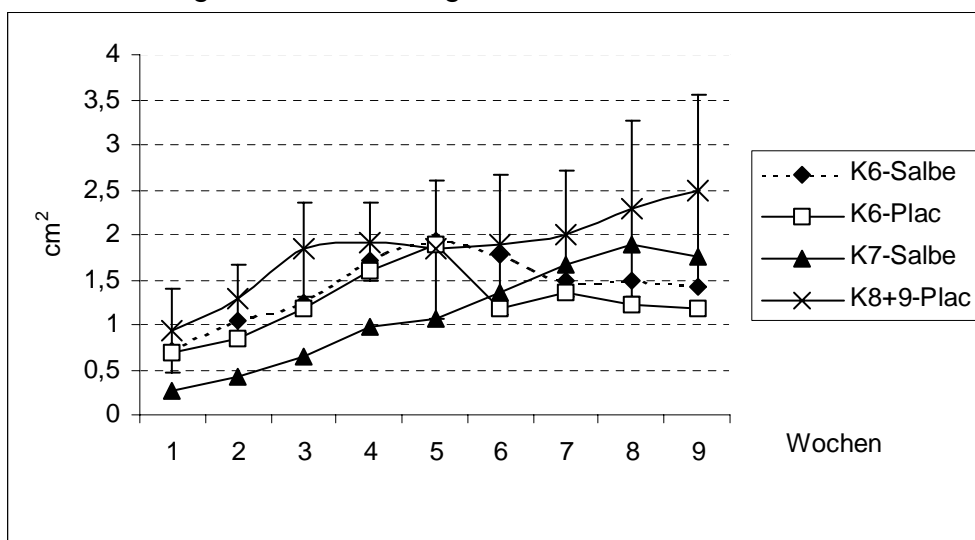


Abb. 20: Absolute Größenentwicklung der Papillome während der Behandlung mit Polyphenon™ E-Creme, Placebo-Creme, Polyphenon™ E-Salbe oder Placebo-Salbe

Einmal wöchentlich wurde die Größe jedes einzelnen Papilloms gemessen und die durchschnittliche Größe pro Tier und Behandlungsagens bestimmt. Die durchschnittliche Größe der Papillome wird in cm^2 angegeben

(A) Die mit Polyphenon™ E-Creme behandelten Papillome von Kaninchen 1 und 2 (K1+2-Creme), ebenso wie deren mit Placebo behandelten Papillome (K1+2-Plac), und die mit Placebo-Creme behandelten Papillome von Kaninchen 4 und 5 (K4+5-Plac) wurden zusammengefasst.

(B) Die mit Placebo-Salbe behandelten Papillome von Kaninchen 8 und 9 (K8+9-Plac) wurden zusammengefasst.

Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

4 Diskussion

4.1 Rolle der Transaktivierungsdomäne von CRPV-E2 und des Repressorproteins E9^{E2C} im viralen Replikationszyklus

Die kausale Rolle bestimmter Papillomvirustypen bei der Entstehung von Zervixkarzinomen ist anerkannt, und in neuerer Zeit gibt es auch vermehrt Veröffentlichungen, die einen Zusammenhang zwischen Papillomviren und Hautkarzinomen wie dem nicht-melanozytären Hautkrebs herstellen (Bosch et al., 2002; Frost and Green, 1994; Harwood et al., 2000; Iftner et al., eingereicht; Leigh and Glover, 1995; Proby et al., 1996; zur Hausen, 1991). Schon 1935 wurde durch Rous und Beard ein solcher Zusammenhang beim Hauskaninchen aufgezeigt. Die Infektion von Hauskaninchen mit dem cottontail rabbit Papillomavirus (CRPV) induziert die Bildung epithelialer Tumoren, die ohne Einfluss weiterer Kofaktoren in über 80% der Fälle nach 8 bis 14 Monaten zu invasiv wachsenden, metastasierenden Hautkarzinomen progredieren (Syverton, 1952). Bis heute stellt das Hauskaninchen in Verbindung mit CRPV das einzige bekannte Tiermodellsystem dar, um den Einfluss viraler Faktoren auf einzelne Schritte in der Entstehung und Progression eines Hauttumors aufzuklären. Frühere Studien zeigten, dass außer dem E5 und dem L2 Protein fast alle CRPV-Proteine für die Tumorentstehung notwendig sind, vor allem die viralen Onkoproteine E6 und E7, deren RNAs in allen Stadien von der Tumorentstehung über die Progression bis zur Metastasierung gleichmäßig stark exprimiert werden (Brandsma et al., 1991; Brandsma et al., 1992; Meyers et al., 1992; Nasserri et al. 1989; Wu et al. 1994; Zeltner et al., 1994). Die Transkription dieser Onkogene wird durch das virale E2-Protein reguliert. Um dessen Bedeutung bei der Tumorentstehung zu beurteilen, wurden in früheren Untersuchungen Frameshift-Mutationen in E2 eingeführt, die eine Tumorinduktion im Kaninchen verhinderten (Wu et al., 1994). Allen Mutationen war eigen, dass C-terminal verkürzte E2-Proteine entstanden. Bei E2 handelt es sich jedoch um ein multifunktionales Protein, von dem bisher bekannt ist, dass es nicht nur für die Transaktivierung und Repression der viralen Transkription, sondern auch für die Regulation der

viralen DNA Replikation und für die Anheftung der viralen DNA an die Wirtschromosomen bei der Zellteilung zuständig ist (McBride et al., 1991; Ilves et al., 1999; Lehman und Botchan, 1998; Skiadopoulos und McBride, 1998). Da der C-Terminus die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne von E2 beinhaltet, die für jede der Funktionen von E2 essentiell ist, kann die fehlende Tumorinduktion keiner spezifischen Funktion des E2-Proteins zugeordnet werden. Durch die Einführung von Punktmutationen in CRPV-E2 gelang es im Rahmen dieser Promotionsarbeit, die Transaktivierungsfunktion von der Replikationsfunktion genetisch zu trennen. Übereinstimmend mit früheren Veröffentlichungen bei anderen Papillomviren konnte den hoch konservierten Aminosäuren 37 –Arginin (R37), 73 - Isoleucin (I73) und 39 – Glutaminsäure (E39) von CRPV-E2 eine essentielle Rolle für die Transaktivierung synthetischer Reporterplasmide oder für die Unterstützung der E1-abhängigen Replikation von Plasmiden mit dem CRPV-Replikationsursprung zugeordnet werden (Brokaw et al., 1996; Cooper et al., 1998; Harris und Botchan, 1999; Sakei et al., 1996; Stubenrauch et al., 1998). Der Austausch von R37 gegen das biochemisch ähnliche Lysin hatte im Gegensatz zu dem Austausch gegen Alanin keine Auswirkung auf die Transkriptionsstimulierung, wie dies auch für die gleiche Mutation in BPV 1-E2 beschrieben wurde. Dies steht jedoch im Widerspruch zur gleichen Mutation in HPV 11-E2 oder 31-E2, bei denen sie einen fast vollständigen Verlust der Transaktivierungseffizienz verursachte (Brokaw et al., 1996; Cooper et al., 1998; Stubenrauch et al., 1998). Um die Bedeutung der Transaktivierungsdomäne von CRPV-E2 auf Tumorentstehung und –progression *in vivo* zu untersuchen, wurden entsprechende Mutationen (R37K, R37A, I73L, I73A) in das CRPV Gesamtgenom eingeführt und in die Haut von Hauskaninchen injiziert. Interessanterweise lag ein fast vollständiger Verlust der Tumorentstehung nach Injektion mit diesen mutierten CRPV-DNAs vor. Dies war das erste Mal, dass diese transaktivierungsdefizienten Mutanten in einem Tiermodell untersucht wurden, bisher wurde von anderen Arbeitsgruppen nur die Wirkung entsprechender E2-Mutationen, die in das BPV 1 oder HPV 31 Gesamtgenom eingeführt wurden, auf die Transformation oder Immortalisierung von Zellen untersucht. Diese Mutationen verursachten einen fast vollständigen

Verlust der Transformationsaktivität von BPV 1 in C127 Mäusefibroblasten (Brokaw et al., 1996). Im Fall der transaktivierungsdefizienten Mutanten kann der Verlust dieser transformierenden Eigenschaft eventuell auf eine verminderte Expression der transformierenden Proteine E6, E7 und E5 von BPV 1 zurückgeführt werden, für deren Expression virale Promotoren zuständig sind, die von einer Transaktivierung durch BPV 1-E2 abhängig sind (Brokaw et al., 1996; Haugen et al., 1987; Hermonat et al., 1988; Prakash et al., 1988; Spalholz et al., 1987). Während bei BPV 1 der Effekt gesamtgenomischer E2-Mutanten auf die morphologische Transformation von Zelllinien untersucht wurde, wurde bei HPV 31 der Effekt entsprechender Mutanten auf die Immortalisierung primärer humaner Keratinozyten untersucht. Dabei zeigte sich, dass die transaktivierungsdefizienten Mutationen im E2-Gen des HPV 31-Genoms keinen Einfluss auf die Immortalisierung humaner Keratinozyten verglichen mit Wildtyp-HPV 31 haben (Stubenrauch et al., 1998). Der fehlende Unterschied in der Immortalisierungseffizienz lässt sich eventuell darauf zurückführen, dass diese Mutanten einen ähnlichen Effekt wie Wildtyp-HPV 31 auf den viralen p97 Promotor haben. Dieser Promotor ist an der Expression der viralen Onkogene E6 und E7 bei HPV 31 beteiligt, die für die Immortalisierung primärer Zellen nötig sind. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Transformation von Zellen, der Immortalisierung von Zellen und der Tumorentstehung *in vivo* ist bisher aber nicht bekannt. *In vivo* findet man kurz nach der Infektion von Hauskaninchen mit CRPV hohe Mengen an E6 und E7 Transkripten und auch nachweisbare E2 Transkripte in den epithelialen Stammzellen der Haarfollikel (Schmitt et al., 1996). Diese hohen Mengen an E6 und E7 Transkripten bleiben während der gesamten Tumorentwicklung und –progression erhalten (Zeltner et al., 1994). Da E2 ein Regulator der Transkription ist, ist es leicht nachvollziehbar, dass der Verlust seiner Transaktivierungsfähigkeit Auswirkungen auf Tumorentstehung und –wachstum hat. Bisher ist allerdings noch nicht bekannt, wie E2 jeden einzelnen der vier CRPV-Promotoren reguliert. Nur Versuche mit Reporterkonstrukten, die mehr als einen Promotor beinhalteten, wurden bisher von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt. Dabei zeigte sich einerseits, dass CRPV-E2 ein Reporterkonstrukt mit dem späten und einem frühen Promotor

reprimierte, andererseits ein Konstrukt mit einem zusätzlichen zweiten frühen Promotor aktivierte (Fujii et al., 2001; Giri et al., 1988). Mittels Untersuchung der Regulation jedes einzelnen Promotors durch Wildtyp-E2 und durch mutationshaltige-E2s könnten eventuelle promotorspezifische und mutantenspezifische Effekte identifiziert werden. Vielleicht wäre dabei auch ein promotorspezifischer Effekt der R37K-Mutante festzustellen, die auf den untersuchten synthetischen Promotor transaktivierungskompetent wirkte und trotzdem keine Tumoren im Kaninchen verursachte. Auch die entsprechende transaktivierungs- und replikationskompetente Mutation in BPV 1 verhinderte die Transformation von Zellen (Brokaw et al., 1996). Warum die Tumorinduktion oder Zelltransformation in diesem Falle ausbleibt, ist bisher unklar. Außer einem möglichen promotorspezifischen Effekt wäre auch eine Auswirkung auf eine weitere bisher nicht untersuchte oder noch nicht bekannte Funktion von E2 durch Mutation der Aminosäure 37 denkbar.

Neben dem Transkript für das vollständige E2-Protein wurde bei BPV 1 und einigen humanen Papillomviren ein alternativ gespleißtes E2-Transkript beschrieben, dessen Translationsprodukt als Gegenspieler zur transaktivierenden und replikationsfördernden Funktion von E2 fungiert (Bouvard et al., 1994; Choe et al., 1989; Doorbar et al., 1990; Lambert et al., 1987; Lambert et al., 1990; Rotenberg et al., 1989; Snijders et al., 1992; Stubenrauch et al., 2000). Diese Fusionsproteine bestehen aus einem kleinen Protein (E8), für das in einem überlappenden Leserahmen zu E1 kodiert wird, und der Hinge und dem C-Terminus von E2. Ein strukturell vergleichbares Transkript konnte aus CRPV-induzierten Tumoren isoliert werden und wurde E9^ΔE2C genannt. CRPV-E9^ΔE2C konnte übereinstimmend mit Veröffentlichungen über die anderen Fusionsproteine als E2-Repressor charakterisiert werden, der die E2-abhängige Replikation und Transaktivierung inhibierte (Bouvard et al., 1994; Choe et al., 1989; Liu et al., 1995; Stubenrauch et al., 2000). Die Repressorwirkung von E9^ΔE2C kann nicht auf eine reine Konkurrenz mit dem vollständigen E2-Protein um E2-DNA-Bindungsstellen oder auf eine Heterodimerbildung zwischen dem vollständigen E2 und E9^ΔE2C beschränkt werden, da CRPV-E9^ΔE2C auch alleine in Abwesenheit des vollständigen E2-Proteins eine reprimierende

Wirkung auf Reporterkonstrukte mit verschiedenen viralen Promotoren hatte, wie dies auch schon für das entsprechende Fusionsprotein von HPV 31 beschrieben wurde (Stubenrauch et al., 2001). In diesem Zusammenhang wurde bereits postuliert, dass es sich bei diesem Fusionsprotein eventuell um einen Repressor aller viralen Promotoren und den Hauptrepressor der HPV-Transkription handelt, der an der Etablierung latenter und persistierender Infektionen oder an der differenzierungsabhängigen Umschaltung von der frühen zur späten viralen Phase bei Papillomviren mitbeteiligt sein könnte (Stubenrauch et al., 2001). *In vivo*-Untersuchungen in Kaninchen mit knock-out Mutationen von E9^{E2C} im CRPV-Gesamtgenom lieferten interessanterweise keinen Hinweis auf eine wesentliche Rolle von E9^{E2C}, da im Vergleich zu mit Wildtyp-CRPV-DNA injizierten Kaninchen kein Unterschied in Tumorentstehungsrate, -wachstum, -progression, CRPV-Kopienzahl, physikalischem Status der DNA und CRPV-Transkriptmenge vorlag. Im Gegensatz dazu erhöhten vergleichbare Mutationen im HPV 31-Gesamtgenom die virale DNA-Replikation in transienten Versuchen in primären humanen Keratinozyten deutlich und im Langzeitversuch hatten die selben Mutationen einen Einfluss auf den physikalischen Status der DNA: es lagen keine HPV 31-Genome mehr episomal vor (Stubenrauch et al., 2000). Den Ergebnissen in den Kaninchen ähnlicher sind *in vitro*-Daten mit vergleichbaren knock-out Mutationen im BPV 1-Genom. Es zeigte sich kein Unterschied in Replikationseffizienz, viraler Transkription oder zellulärer Transformation zwischen stabil mit Wildtyp-BPV 1-DNA oder Mutanten-BPV 1-DNA transfizierten Zellen (Lambert et al., 1990). Da sich auch der entsprechende Expressionsvektor von BPV 1 vergleichbar zu dem E9^{E2C}-Expressionsvektor von CRPV *in vitro* verhielt, liegt die Vermutung nahe, dass beide eine ähnliche Rolle im viralen Replikationszyklus spielen (Choe et al., 1989). Bei BPV 1 ist noch ein weiteres E2-Repressorprotein bekannt, das aus Teilen der Hinge-Region und dem C-Terminus von E2 besteht und sich *in vitro* wie die Fusionsproteine als Repressorprotein darstellt (Choe et al., 1989). Knock-out dieses verkürzten E2-Proteins im BPV 1-Gesamtgenom zeigte aber sehr wohl einen Effekt in stabil transfizierten Zellen: sowohl die virale DNA-Replikation und Transkription als auch die zelluläre Transformation wurden erhöht (Lambert et al., 1990; Riese et

al., 1990). Eine Kombination der knock-out Mutationen beider Repressorproteine im BPV 1-Genom hatte einen nochmals veränderten Phänotyp, so dass im viralen Replikationszyklus wohl ein Zusammenspiel beider Repressorproteine vorliegt (Lambert et al., 1990; Zemlo et al., 1994). Dies wiederum suggeriert, dass eventuell auch in CRPV ein zweites Repressorprotein vorliegt, da sich E9^{E2C} sowohl strukturell als auch funktionell ähnlich zu dem einen Repressorprotein von BPV 1 verhält. Ein vergleichbares zweites Repressorprotein konnte in CRPV bisher aber nicht identifiziert werden, auch frühere Untersuchungen, die Transkripte in CRPV-E2 lokalisierten, ergaben keinen Hinweis auf ein Transkript für ein entsprechendes verkürztes E2-Protein (Wettstein et al., 1987). Die Rolle von CRPV-E9^{E2C} im viralen Replikationszyklus ist somit noch ungeklärt. Stubenrauch postulierte 2001, dass die reprimierenden Fusionsproteine an der differenzierungsabhängigen Umschaltung von der frühen viralen Phase zur späten mitbeteiligt sind. Der fehlende Phänotyp im Hauskaninchen könnte also eventuell mit dem verwendeten Tiermodell erklärt werden. Das Hauskaninchen ist ein nicht-permissiver Wirt für CRPV, es werden kaum späte Genprodukte exprimiert und es findet nur eine geringe DNA-Replikation statt (Syverton et al., 1952). Die Ursache für das Ausbleiben der Umschaltung zur späten viralen Phase ist noch unbekannt. Sollte sich die Bedeutung von CRPV-E9^{E2C} auf diese späte Phase des viralen Replikationszyklus beschränken, so ist leicht verständlich warum im Hauskaninchen kein Phänotyp beobachtet werden kann. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass das E9^{E2C}-Protein eventuell im Hauskaninchen aus noch unbekanntem Gründen nicht exprimiert wird und vielleicht deshalb der Wechsel in die späte Phase des viralen Replikationszyklus verhindert wird. Letztendlich wäre in dem Falle, das Fehlen der Proteinexpression von E9^{E2C} möglicherweise für das stark progressive Verhalten von CRPV in Hauskaninchen verantwortlich. Diese theoretische Möglichkeit konnte von uns leider nicht ausgeschlossen werden, da es bisher keinen spezifischen Antikörper gegen E9 gibt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren R37 und I73 in der Transaktivierungsdomäne von CRPV-E2 für die Papillomentstehung im

Hauskaninchen essentiell sind. Dies suggeriert, dass die Fähigkeit von E2, die virale und/ oder zelluläre Genexpression zu stimulieren, an der papillomvirusvermittelten Tumorinduktion beteiligt ist und damit ein interessantes Ziel für mögliche Therapieansätze darstellt. Das Vorhandensein oder Fehlen des E2-Repressorproteins E9^{E2C} in CRPV zeigte hingegen keinen Einfluss auf Tumorentstehung und -entwicklung, seine Bedeutung muss noch geklärt werden.

4.2 Wirksamkeit von PolyphenonTM E gegen CRPV-induzierte Hauttumoren

Wirksame Therapien gegen papillomvirusinduzierte Tumoren, die möglichst nebenwirkungsfrei und reizarm sind, ohne größeren Aufwand durch den Patienten selbst appliziert werden können und keine Rezidivbildung nach sich ziehen, stehen kaum zur Verfügung. Insbesondere am empfindlichen externen Genitalgewebe gibt es keine wirksamen Alternativen zur chirurgischen Intervention oder dem Immunstimulans „Aldara“. Polyphenole aus grünem Tee wurden anti-tumorigene Eigenschaften nachgewiesen insbesondere im Zusammenhang mit Hauttumoren anderer Genese, wie chemisch- oder durch UV-B-Licht-induzierten (Mukhtar et al., 1994). Als Modell für die besonders durch HPV 6- oder 11-induzierten Tumoren der externen Genitalia beim Menschen dienten hier die CRPV-induzierten Hautpapillome beim Hauskaninchen. Die Wirksamkeit von Polyphenolen in PolyphenonTM E- Formulierungen auf CRPV-induzierte Tumoren sollte untersucht werden. Obwohl Vorversuche beim Menschen sehr vielversprechend verliefen (klinische Phase III Studie), konnte in diesem ersten Therapieversuch bei Kaninchen kein Effekt von PolyphenonTM E auf das Wachstum CRPV-induzierter Papillome nachgewiesen werden, es fand weder ein verlangsamtes Wachstum noch eine Regression der Papillome statt. Für die fehlende Wirksamkeit sind verschiedene Ursachen möglich. Sieht man davon ab, dass eventuell überhaupt keine Wirksamkeit von PolyphenonTM E gegen papillomvirusinduzierte Tumoren vorliegt, was den erfolgsversprechenden Vorversuchen widersprechen würde, besteht die Möglichkeit, dass es sich beim

Hauskaninchen nicht um ein geeignetes Tiermodell handelt, oder dass die Versuchsbedingungen noch optimiert werden müssen. Einen Mangel im Versuchsaufbau stellte der vermutlich zu späte Behandlungsbeginn da. Fünf Wochen nach der Infektion waren in diesem Versuchsansatz schon viele Papillome sehr groß und stark verhornt. Diese Verhornung erschwerte das Eindringen der Wirkstoffe von PolyphenonTM E-Creme/ -Salbe erheblich und schränkte damit deren Wirksamkeit ein. Allerdings war selbst bei den kleineren und schwächer verhornten Papillomen der Kaninchen 3 und 7 ebenso wie bei den erst später entstandenen und dann sofort mitbehandelten Papillomen kein Behandlungserfolg zu beobachten. In Bezug auf eine klinische Anwendbarkeit muss berücksichtigt werden, dass auch bei den Zieltumoren der Behandlung, den Papillomen der externen Genitalia, zum Teil eine erhebliche Verhornung vorliegt und nicht von einem sofortigen Behandlungsbeginn ausgegangen werden kann. Um allerdings beurteilen zu können, ob PolyphenonTM E überhaupt gegen CRPV-induzierte Tumoren wirksam ist, wäre eine erneute Versuchsdurchführung wünschenswert, bei der Papillome sobald sie palpabel sind, behandelt werden oder sogar die Infektionsstellen präventiv nach Infektion aber vor Papillomentstehung behandelt werden. Die präventive Wirkung von Polyphenolen auf die Entstehung von Hauttumoren nach chemischer oder solarer Induktion wurde schon mehrfach beschrieben (Mukhtar et al., 1994). Bei positivem Verlauf wäre zumindest die Wirksamkeit von PolyphenonTM E auf die CRPV-verursachte Tumorinduktion oder –wachstum bestätigt, die klinische Anwendbarkeit müsste dann Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Bei negativem Verlauf könnte eine weitere Erklärung darin liegen, dass das Hauskaninchen eventuell kein geeignetes Tiermodell für die Papillomentstehung an externen Genitalien ist. Bei CRPV im Hauskaninchen handelt es sich um eine abortive Infektion, es werden keine vollständigen Viruspartikel gebildet, und es liegt eine sehr hohe Progressionstendenz nach nur wenigen Monaten vor. Im Gegensatz dazu progredieren HPV 6- und 11-induzierte Tumoren in der Regel nicht und die Infektionen sind produktiv. Es ist also unklar, in wie weit die stattfindenden molekularen Prozesse im Kaninchen und Menschen während der Papillominduktion und dem frühen Wachstum identisch sind. Insbesondere in der

späteren Phase der Tumorpersistenz oder –progression sind Unterschiede zu erwarten, die in diesem Therapieversuch aber keine Rolle spielen dürften. Ein geeignetes alternatives Tiermodell steht allerdings nicht zur Verfügung. Infektion eines cottontail rabbits mit CRPV ist zwar produktiv und nur in bis zu 23% aller Fälle progressiv, aber das Baumwollschwanzkaninchen steht unter Naturschutz und ist in Gefangenschaft nur sehr schwer zu halten. Beim caninen oralen Papillomvirus (COPV) des Hundes handelt es sich um ein produktives Schleimhaut-assoziiertes Virus, das Tumoren in der Mundschleimhaut induziert, die eine sehr starke natürliche Regressionstendenz innerhalb weniger Wochen haben, sodass ein Therapieerfolg schwer und nur mit Hilfe von hohen Fallzahlen beurteilt werden könnte.

Ein Versagen der PolyphenonTM E-Therapie bei papillomvirusinduzierten Tumoren lässt sich aus diesem Versuch bei Hauskaninchen noch nicht ableiten, weitere Versuche mit modifizierter Versuchsdurchführung sind zu empfehlen. Die lokale Verträglichkeit der PolyphenonTM E-Formulierungen ist gut, allerdings muss die unangenehme Geruchsentwicklung insbesondere bei längerer Anwendung der Salben-Formulierung beseitigt werden.

5 Zusammenfassung

Die intrakutane Infektion von Hauskaninchen mit dem Cottontail rabbit Papillomavirus (CRPV) verursacht lokal gutartige Hauttumoren (Papillome), die zu über 80% innerhalb von sechs bis vierzehn Monaten zu invasiv wachsenden Karzinomen progredieren, ohne dass weitere Kofaktoren dazu nötig sind. Somit ist das Hauskaninchen ein geeignetes Tiermodell zur Aufklärung der molekularen Vorgänge bei der Entstehung und Progression kutaner papillomvirusinduzierter Tumoren. Der zentrale Regulator der Transkription der viralen Onkogene und der viralen DNA-Replikation ist das frühe E2-Protein. Eine genetische Trennung dieser beiden Funktionen ist bei BPV 1, HPV 11, 16, 18 und 31 durch Mutation der hochkonservierten Aminosäuren 37, 39 oder 73 möglich. Analoge Mutationen wurden in CRPV-E2 eingeführt und zeigten das gleiche Verhalten. So führte Mutation der Aminosäure 37 oder 73 zu einem Verlust der Transaktivierungseffizienz in Reporterassays im Vergleich zu Wildtyp-CRPV-E2 bei erhaltener Replikationseffizienz. Mutation der Aminosäure 39 von CRPV-E2 hatte den umgekehrten Effekt, bei erhaltener Transaktivierungsfunktion lag ein Verlust der Replikationseffizienz in transienten Replikationsassays vor.

Neben dem Transkript für das vollständige E2-Protein ist bei BPV 1, HPV 11, 16, 31 und 33 ein alternativ gespleißtes E2-Transkript bekannt, dessen Translationsprodukt (E8^ΔE2C) einen E2-Repressor darstellt. Ein entsprechendes Transkript konnte mittels RT-PCR aus CRPV-induzierten Papillomen und Karzinomen verschiedener Kaninchen isoliert werden und wurde E9^ΔE2C genannt. E9^ΔE2C inhibierte konzentrationsabhängig die Transaktivierungsaktivität von CRPV-E2 in Reporterassays und die E2-abhängige transiente Replikation des CRPV-Replikationsursprungs. Zudem reprimierte E9^ΔE2C die Basalaktivität verschiedener Reporterkonstrukte in drei unterschiedlichen Zelllinien.

Um die *in vivo* Bedeutung dieses Repressorproteins und der Transaktivierungsdomäne von CRPV-E2 auf Tumorentstehung und –progression zu untersuchen, wurden Mutationen in das CRPV-Gesamtgenom eingeführt. Diese Mutanten-DNAs wurden ebenso wie Wildtyp-CRPV-DNA mittels Partikel-

vermitteltem DNA-Transfer mit der „Helios gene gun“ in die Haut von Hauskaninchen eingebracht. Mutation der Aminosäure 37 oder 73 in CRPV-E2 führte dabei zu einem fast vollständigem Verlust der Tumorinduktion, während 93% aller mit Wildtyp-CRPV-DNA injizierten Stellen eine Papillomentstehung innerhalb von sechs Wochen vorweisen konnten.

Hingegen zeigten zwei verschiedene knock-out Mutationen in E9 im gesamtgenomischen Kontext von CRPV keinen Unterschied im Vergleich zu Wildtyp-CRPV-DNA bezüglich Tumorentstehung, -progression, CRPV-Kopienzahl, physikalischem Status der DNA und CRPV-Transkriptmengen.

Während die Transaktivierungsdomäne in CRPV-E2 vermutlich essentiell für die Tumorentstehung ist, und damit ein mögliches Ziel für Therapien gegen papillomvirusinduzierte Tumoren darstellt, ist die in vivo Bedeutung des CRPV-E9^{E2C}-Repressorproteins weiterhin unbekannt und erfordert weitere Untersuchungen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war ein Therapieversuch mit zwei unterschiedlichen Polyphenol-Formulierungen. Polyphenole sind der Hauptbestandteil von grünen Tee-Extrakten. Sie zeigten in früheren Untersuchungen ein weites Spektrum an pharmazeutisch interessanten Aktivitäten wie anti-tumorigene, anti-karzinogene u.a. Eigenschaften. Die CRPV-induzierten Hauttumoren beim Hauskaninchen dienten hier als Modell für papillomvirusinduzierte gutartige Tumoren beim Menschen. Trotz achtwöchiger, fast täglicher Behandlung konnte in diesem Versuch keine Wirkung der Polyphenole auf die Tumoren nachgewiesen werden. Es wäre wünschenswert, die Wirksamkeit polyphenolhaltiger Therapeutika gegen CRPV-induzierte Hauttumoren in einem wiederholten Versuch mit modifiziertem Versuchsaufbau erneut zu untersuchen.

6 Summary

Intracutaneous infection of domestic rabbits with the cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) causes local benign skin tumors (papillomas) which progress to carcinomas in more than 80% of cases within six to fourteen months without the need of any cofactors. This animal model system therefore allows the identification of molecular mechanisms required for the induction and progression of epithelial papillomavirus-induced tumors. The early viral E2 protein is the central regulator of both viral DNA replication and transcription of viral oncogenes. These functions can be genetically separated in BPV1, HPV 11, 16, 18 and 31 by mutation of the highly conserved amino acids 37, 39 or 73. Respective mutations were introduced into CRPV-E2 and found to behave correspondingly. Mutation of the amino acid 37 or 73 resulted in a loss of the transactivation activity in reporter assays compared to wild type E2 whereas the replication efficiency was maintained. Mutation of the amino acid 39 in CRPV E2 had the opposite effect, the protein was transactivation competent but replication deficient in transient replication assays.

Aside from the transcript for the full length E2 protein an alternatively spliced E2 transcript is known in BPV 1, HPV 11, 16, 31 and 33 whose translation product (E8^{E2C}) is an E2 repressor protein. A comparable transcript was isolated from CRPV-induced papillomas and carcinomas of different rabbits by RT-PCR and designated E9^{E2C}. E9^{E2C} inhibited the transactivation activity of CRPV-E2 in reporter assays and the E2-dependent transient replication of the CRPV-origin in a concentration dependent manner. Additionally, E9^{E2C} repressed the basal activity of different reporter constructs in three cell lines.

In order to investigate the importance of this repressor protein and of the transactivating domain of CRPV-E2 on tumor induction and progression in vivo, mutations were introduced into the whole genome of CRPV. These mutant DNAs as well as wild type CRPV-DNA were injected into the skin of domestic rabbits by particle-mediated DNA transfer with the "Helios gene gun". Strikingly, the ability to induce tumors within six weeks was almost abolished by mutation of the amino acid 37 or 73 of CRPV-E2, in contrast to the tumor induction rate (93%) obtained

with wild type CRPV-DNA. In comparison to wild type CRPV-DNA two different knockout mutations of E9 within the CRPV genome showed no difference regarding tumor induction, progression, CRPV copy number, physical status of the DNA and amount of CRPV transcripts.

The transactivating domain of CRPV-E2 seems to be essential for tumor induction and therefore represents a possible target for therapies against papillomavirus-induced tumors, in contrast the in vivo importance of the CRPV-E9^{E2C} repressor protein remains to be determined.

Two different formulations of polyphenols were used in a therapy trial. Polyphenols are the main components in extracts from green tea and they are known to have a number of pharmaceutically interesting properties like anti-tumorigenic and anti-carcinogenic activities. The CRPV-induced tumors in the domestic rabbit served as model for benign papillomavirus-induced tumors in men. In spite of an almost daily treatment for eight weeks no effect of the polyphenols on tumor growth could be demonstrated in this experiment. A further experiment with modified experimental conditions is recommended to investigate the efficacy of polyphenols on CRPV-induced tumors.

7 Literaturverzeichnis

- Alwine, J.C., D.J. Kemp, and G.R. Stark.** 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**:5350-5354.
- Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., and Smith, J. A.** 1990. *Current protocols in molecular biology* (Struhl, K. Ed.) Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.
- Barbosa M.S., and F.O. Wettstein.** 1988. The two proteins encoded by the cottontail rabbit papillomavirus E6 open reading frame differ with respect to localization and phosphorylation. *J Virol.* **62**:1088-1092.
- Barbosa, M.S., and F.O. Wettstein.** 1988. E2 of cottontail rabbit papillomavirus is a nuclear phosphoprotein translated from an mRNA encoding multiple open reading frames. *J. Virol.* **62**:3242-3249.
- Berkhout, R. J., L.M. Tieben, H.L. Smits, J.N. Bavinck, B.J. Vermeer, and J. ter Schegget.** 1995. Nested PCR approach for detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 690-695.
- Bernard, B.A., C. Bailly, M.C. Lenoir, M. Darmon, F. Thierry , and M. Yaniv.** 1989. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J. Virol.* **63**: 4317-4324.
- Bosch F.X., A. Lorincz, N. Munoz, C.J. Meijer, and K.V. Shah.** 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.* **55**:244-265. Review.
- Bouvard, V., A. Storey, D. Pim, and L. Banks.** 1994. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.* **13**:5451-5459
- Boxman, I.L., R.J. Berkhout, L.H. Mulder, M.C. Wolkers, J.N. Bouwes Bavinck, B.J. Vermeer, and J. ter Schegget.** 1997. Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J. Invest. Dermatol.* **108**:712-715.

- Brandsma, J.L., Z.H. Yang, D. DiMaio, S.W. Barthold, E. Johnson, and W. Xiao.** 1992. The putative E5 open reading frame of cottontail rabbit papillomavirus is dispensable for papilloma formation in domestic rabbits. *J. Virol.* **66**:6204-6207.
- Brandsma, J.L., Z.H. Yang, S.W. Barthold, and E.A. Johnson.** 1991. Use of a rapid, efficient inoculation method to induce papillomas by cottontail rabbit papillomavirus DNA shows that the E7 gene is required. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**: 4816-20.
- Brokaw, J.L., M. Blanco, and A.A. McBride.** 1996. Amino acids critical for the functions of the bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator. *J. Virol.* **70**:23-29.
- Burnette W.N.** 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**:195-203.
- Campo M.S.** 1997. Bovine papillomavirus and cancer. *Vet. J.* **154**:175-188. Review.
- Chan, S.-Y., Delius, H., Halpern, A. L., and Bernard, H.-U.** 1995. Analysis of genetic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J. Virol.* **69**: 3074-3083
- Chiang, C.M., M. Ustav, A. Stenlund, T.F. Ho, T.R. Broker, and L.T. Chow.** 1992. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**:5799-5803.
- Chiang, C.M., T.R. Broker, and L.T. Chow.** 1991. An E1^ME2^C fusion protein encoded by human papillomavirus type 11 is a sequence-specific transcription repressor. *J. Virol.* **65**:3317-3329
- Choe, J., P. Vaillancourt, A. Stenlund, and M. Botchan.** 1989. Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs. *J. Virol.* **63**:1743-1755.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159
- Cooper, C.S., S.N. Upmeyer, and P.L. Winokur.** 1998. Identification of single amino acids in the human papillomavirus 11 E2 protein critical for the transactivation or replication functions. *Virology* **241**:312-322.

- Dong, G., T.R. Broker, and L.T. Chow.** 1994. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol.* **68**:1115-1127.
- Doorbar, J., A. Parton, K. Hartley, L. Banks, T. Crook, M. Stanley, and L. Crawford.** 1990. Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology.* **178**:254-262
- Elbel, M., Carl, S., Spaderna, S., and Iftner, T.** 1997. A comparative analysis of the interaction of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology.* **239**: 132-149
- Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, and M. Danielsen.** 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **84**:7413-7417.
- Fried, M., and D.M. Crothers.** 1981. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **9**:6505-6525.
- Frost, C. A., and A.C. Green.** 1994. Epidemiology of solar keratoses. *Br. J. Dermatol.* **131**: 455-464
- Fujii, T., J.L. Brandsma, X. Peng, S. Srimatkandada, L. Li, A. Canaan, and A.B. Deisseroth.** 2001. High and low levels of cottontail rabbit papillomavirus E2 protein generate opposite effects on gene expression. *J. Biol. Chem.* **276**:867-874.
- Giri, I., and M. Yaniv.** 1988. Study of the E2 gene product of the cottontail rabbit papillomavirus reveals a common mechanism of transactivation among papillomaviruses. *J. Virol.* **62**:1573-1581.
- Goodrich L., H. Gerber, E. Marti, and D.F. Antczak.** 1998. Equine sarcoids. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.* **14**:607-623.
- Gross, G.E., and R. Barrasso.** 1997. General principles of treatment. *In Human Papilloma Virus Infection. A Clinical Atlas* (Gross/ Barrasso eds.). Ullstein Mosby Verlag. S. 49-60.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580

- Harris, S.F., and M.R. Botchan.** 1999. Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain. *Science* **284**:1673-1677.
- Harwood C.A., T. Suretheran, J.M. McGregor, P.J. Spink, I.M. Leigh, J. Breuer, and C.M. Proby.** 2000. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J. Med. Virol.* **61**:289-297.
- Haugen, T.H., T.P. Cripe, G.D. Ginder, M. Karin, and L.P. Turek.** 1987. Trans-activation of an upstream early gene promoter of bovine papilloma virus-1 by a product of the viral E2 gene. *EMBO J.* **6**:145-152.
- Hawley-Nelson, P., E.J. Androphy, D.R. Lowy, and J.T. Schiller.** 1988. The specific DNA recognition sequence of the bovine papillomavirus E2 protein is an E2-dependent enhancer. *EMBO J.* **7**:525-531.
- Hermonat, P.L., B.A. Spalholz, and P.M. Howley.** 1988. The bovine papillomavirus P2443 promoter is E2 trans-responsive: evidence for E2 autoregulation. *EMBO J.* **7**:2815-2822.
- Higuchi, R., B. Krummel, and R.K. Saiki.** 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16**:7351-7367.
- Hirt, B.** 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* **26**:365-369.
- Hofmann, W.** 1992. Papillomatose. S. 95-96. *IN* K.Loeffler, D.Strauch (ed.) Rinderkrankheiten Band 1. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Howley, P. M.** 1996. Papillomavirinae: The viruses and their replication. *In* Fundamental Virology (Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M., Chanock R. M., eds). **3**: pp 2045-2076. Raven Publishers, Philadelphia
- Hubbert, N.L., J.T. Schiller, D.R. Lowy, and E.J. Androphy.** 1988. Bovine papilloma virus-transformed cells contain multiple E2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5864-5868.
- Huibregtse, J. M., and M. Scheffner+.** 1994. Mechanisms of tumor suppressor protein inactivation by the human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins. *Semin. Virol.* **5**: 357-367
- Ilves, I., S. Kivi, and M. Ustav.** 1999. Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host

chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites. J. Virol. **73**:4404-4412.

Jablonska, S., and G. Orth. 1985. Epidermodysplasia verruciformis. Clin. Dermatol. **3**: 83-96

Koutsky, L.A., D.A. Galloway, and K.K. Holmes. 1988. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. Epidemiol. Rev. **10**:122-163. Review.

Laimins, L. A. 1996. Human papillomaviruses target differentiating epithelia for virion production and malignant conversion. Seminars in Virology **7**: 305-313

Lambert, P.F., B.A. Spalholz, and P.M. Howley. 1987. A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. Cell **50**:69-78.

Lambert, P.F., B.C. Monk, and P.M. Howley. 1990. Phenotypic analysis of bovine papillomavirus type 1 E2 repressor mutants. J. Virol. **64**:950-956.

Lehman, C.W., and M.R. Botchan. 1998. Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **95**:4338-4343.

Leigh, I. M., and M.T. Glover. 1995. Skin cancer and warts in immunosuppressed renal transplant recipients. *In*: Recent Results in Cancer Research. **139**: 69-86

Liu, J.S., S.R. Kuo, T.R. Broker, and L.T. Chow. 1995. The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. J. Biol. Chem. **270**:27283-27291

Lohff C.J., and K.B. Cease. 1992. PCR using a thermostable polymerase with 3' to 5' exonuclease activity generates blunt products suitable for direct cloning. Nucleic Acids Res. **20**:144.

Lutzner, M. A. 1978. *Epidermodysplasia verruciformis*. An autosomal recessive disease characterized by viral warts and skin cancer. A model for viral oncogenesis. Bull. Cancer Paris. **65**: 169-182

Maniatis, T., Sambrook, J., and Fritsch, E. F. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (Maniatis, T. Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

McBride, A.A., H. Romanczuk, and P.M. Howley. 1991. The papillomavirus E2 regulatory proteins. J. Biol. Chem. **266**:18411-1814.

- Meyers, C., J. Harry, Y.L. Lin, and F.O. Wettstein.** 1992. Identification of three transforming proteins encoded by cottontail rabbit papillomavirus. *J. Virol.* **66**:1655-1664.
- Miller, R.L., J.F. Gerster, M.L. Owens, H.B. Slade, and M.A. Tomai.** 1999. Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int. J. Immunopharmacol.* **21**:1-14. Review.
- Mukhtar, H., S.K. Katiyar, and R. Agarwal.** 1994. Green tea and skin--anticarcinogenic effects. *J. Invest. Dermatol.* **102**:3-7. Review.
- Nasseri, M., C. Meyers, and F.O. Wettstein.** 1989. Genetic analysis of CRPV pathogenesis: the L1 open reading frame is dispensable for cellular transformation but is required for papilloma formation. *Virology* **170**:321-325.
- Nicholls P.K., and M.A. Stanley.** 1999. Canine papillomavirus--A centenary review. *J. Comp. Pathol.* **120**:219-233. Review.
- Orth, G.** 1987. *The Papovaviridae* (Salzman, N. P. and Howley, P. M. Eds.) Plenum Press, New York. 199-243
- Peh, W., J. Brandsma, N. Cladel, N. Christensen and J. Doorbar.** 2001. Production of papillomas in cottontail and domestic rabbits using CRPV knockout mutants reveals an essential role for E4 in viral replication and capsid synthesis. Oral presentation at 19th International Papillomavirus Conference in Florianopolis 2001.
- Pfister, H.** 1992. Human papillomaviruses and skin cancer. *Semin. Cancer Biol.* **3**: 263-271.
- Prakash, S.S., B.H. Horwitz, T. Zibello, J. Settleman, and D. DiMaio.** 1988. Bovine papillomavirus E2 gene regulates expression of the viral E5 transforming gene. *J. Virol.* **62**:3608-3613.
- Proby, C., A. Storey, J. McGregor, and I. Leigh.** 1996. Does human papillomavirus infection play a role in non-melanoma skin cancer? *Papillomavirus Report.* **7**: 53-60.
- Rapp, B., A. Pawellek, F. Kraetzer, M. Schaefer, C. May, K. Purdie, K. Grassmann, and T. Iftner.** 1997. Cell-type-specific separate regulation of the E6 and E7 promoters of human papillomavirus type 6a by the viral transcription factor E2. *J. Virol.* **71**:6956-6966.

- Rheinwald, J.G., and H. Green.** 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. **6**:331-343.
- Rheinwald, J.G., and M.A. Beckett.** 1981 Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultures from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* **41**:1657-1663.
- Riese, D.J., II, J. Settleman, K. Neary, and D. DiMaio.** 1990. Bovine papillomavirus E2 repressor mutant displays a high-copy-number phenotype and enhanced transforming activity. *J. Virol.* **64**:944-949
- Romanczuk, H., and P.M. Howley.** 1992. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**:3159-3163.
- Romanczuk, H., F. Thierry, and P.M. Howley.** 1990. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J. Virol.* **64**:2849-2859.
- Rotenberg, M.O., L.T. Chow, and T.R. Broker.** 1989. Characterization of rare human papillomavirus type 11 mRNAs coding for regulatory and structural proteins, using the polymerase chain reaction. *Virology* **172**:489-497
- Rous. P., and J.W. Beard.** 1935. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). *J. of exp. Med.* **62**: 523-548
- Saiki, R.K., T.L. Bugawan, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich.** 1986. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**:163-166.
- Sakai, H., T. Yasugi, J.D. Benson, J.J. Dowhanick, and P.M. Howley.** 1996. Targeted mutagenesis of the human papillomavirus type 16 E2 transactivation domain reveals separable transcriptional activation and DNA replication functions. *J. Virol.* **70**:1602-1611.
- Salmon J., M. Nonnenmacher, S. Caze, P. Flamant, O. Croissant, G. Orth, and F. Breitburd.** 2000. Variation in the nucleotide sequence of cottontail rabbit papillomavirus a and b subtypes affects wart regression and malignant transformation and level of viral replication in domestic rabbits. *J. Virol.* **74**:10766-10777.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- Schmitt, A., A. Rochat, R. Zeltner, L. Borenstein, Y. Barrandon, F.O. Wettstein, and T. Iftner.** 1996. The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. *J. Virol.* **70**:1912-1922.
- Schmitt, A., Harry, J. B., Rapp, B., Wettstein, F. O., and Iftner T..** 1994. Comparison of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity of the low-risk human papillomavirus type 1. *J. Virol.* **68**: 7051-7059
- Sealey, L., and R. Chalkley.** 1987. At least two nuclear proteins bind specifically to the Rous sarcoma virus long terminal repeat enhancer. *Mol. Cell Biol.* **7**:787-798.
- Shamanin V., M. Glover, C. Rausch, C. Proby, I.M. Leigh, and H. zur Hausen.** 1994. Specific types of human papillomaviruses found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients. *Cancer Res.* **54**: 4610-4613
- Shamanin, V., H. zur Hausen, D. Lavergne, C. Proby, I. Leigh, C. Neumann, H. Hamm, M. Goos, U.-F. Haustein, E. Jung, G. Plewig, H. Wolff, and E.-M. de Villiers.** 1995. HPV infections in non-melanoma skin cancers from renal transplant recipients and non-immunosuppressed patients.
- Shope, R. E. and Hurst E. W.** 1933. Infectious papillomatosis of rabbits. *J. Exp. Med.* **68**: 607-623
- Skiadopoulos, M.H., and A.A. McBride.** 1998. Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J. Virol.* **72**:2079-2088.
- Snijders, P.J., A.J. van den Brule, H.F. Schrijnemakers, P.M. Raaphorst, C.J. Meijer, and J.M. Walboomers.** 1992. Human papillomavirus type 33 in a tonsillar carcinoma generates its putative E7 mRNA via two E6* transcript species which are terminated at different early region poly(A) sites. *J. Virol.* **66**:3172-3178.
- Southern, E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- Spalholz, B.A., P.F. Lambert, C.L. Yee, and P.M. Howley.** 1987. Bovine papillomavirus transcriptional regulation: localization of the E2-responsive elements of the long control region. *J. Virol.* **61**:2128-2137.
- Stanley, M.A.** 1999. Mechanism of Action of Imiquimod. *Papillomavirus Report.* Vol. 10, number 2: 23-29

- Stenlund, A.** 1996. Papillomavirus DNA replication, p. 679-698. *In* M.L. DePamphilis (ed.), DNA replication in eukaryotic cells. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Stubenrauch F., and L.A. Laimins.** 1999. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin. Cancer Biol.* **9**:379-386. Review.
- Stubenrauch, F. und Iftner, T.** 1999. Krebs durch Papillomviren. *TargetForum.* **1**: 5-15
- Stubenrauch, F., A.M. Colbert, and L.A. Laimins.** 1998. Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions. *J. Virol.* **72**:8115-8123.
- Stubenrauch, F., M. Hummel, T. Iftner, and L.A. Laimins.** 2000. The E8^{E2C} protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J. Virol.* **74**:1178-1186.
- Stubenrauch, F., T. Zobel, and T. Iftner.** 2001. The E8 domain confers a novel long distance transcriptional repression activity on the E8^{E2C} protein of high-Risk Human Papillomavirus Type 31. *J. Virol.* **75**: 4139-4149.
- Syverton, J. T.** 1952. The pathogenesis of the rabbit papilloma-to carcinoma sequence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **54**:1126-1140
- Teifke J.P.** 1994. Morphologic and molecular biologic studies of the etiology of equine sarcoid. *Tierärztl. Prax.* **22**:368-376.
- Tyring, S.K., I. Arany, M.A. Stanley, M.A. Tomai, R.L. Miller, M.H. Smith, D.J. McDermott, and H.B. Slade.** 1998. A randomized, controlled, molecular study of condylomata acuminata clearance during treatment with imiquimod. *J. Infect. Dis.* **178**:551-555.
- Vousden, K. H.** 1995. Regulation of the cell cycle by viral oncoproteins. *Semin. Cancer Biol.* **6**: 109-116
- Walboomers, J.M.M., A.-M. De Roda Husman, A.J.C. Van Den Brule, P.J.F. Snijders, and C.J.L.M. Meijer.** 1994. Human Papillomaviruses and Cervical Cancer (P.L. Stern and M.A. Stanley Eds.) Oxford University Press, Oxford: 41-69.
- Wettstein, F.O.** 1987. Papillomaviruses and carcinogenic progression I – Cottontail Rabbit (Shope) papillomavirus, p. 167-186. *In* N.P. Salzman and P.M. Howley (ed.), *The Papovaviridae*, Vol. 2. Plenum Publishing Corporation.

- Wettstein, F.O., M.S. Barbosa, and M. Nasseri.** 1987. Identification of the major cottontail rabbit papillomavirus late RNA cap site and mapping and quantitation of an E2 and minor E6 coding mRNA in papillomas and carcinomas. *Virology* **159**:321-328
- Wu, X., W. Xiao, and J.L. Brandsma.** 1994. Papilloma formation by cottontail rabbit papillomavirus requires E1 and E2 regulatory genes in addition to E6 and E7 transforming genes. *J. Virol.* **68**:6097-6102.
- Xiao, W., and J.L. Brandsma.** 1996. High efficiency, long-term clinical expression of cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) DNA in rabbit skin following particle-mediated DNA transfer. *Nucleic Acids Res.* **24**:2620-2622.
- Zeltner, R., L.A. Borenstein, F.O. Wettstein, and T. Iftner.** 1994. Changes in RNA expression pattern during the malignant progression of cottontail rabbit papillomavirus-induced tumors in rabbits. *J. Virol.* **68**:3620-3630.
- Zemlo, T.R., B. Lohrbach, and P.F. Lambert.** 1994. Role of transcriptional repressors in transformation by bovine papillomavirus type 1. *J. Virol.* **68**:6787-6793
- zur Hausen, H.** 1991. Viruses in human cancers. *Science* **254**: 1167-1173
- zur Hausen, H.** 1994. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* **184**: 9-13.

8 Danksagung

Allen sei vielmals gedankt, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Iftner für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit der Nutzung von Labor und Arbeitsmitteln, seine fachliche Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft, die vielen guten Denkanstöße und vor allen Dingen für die freundliche Atmosphäre, in der das alles stattfand.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Thiel danke ich für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen und für die zügige Begutachtung dieser Doktorarbeit.

Mein Dank gilt auch Dr. Frank Stubenrauch, der mich in die Tücken der Molekularbiologie eingearbeitet hat und immer für Diskussionen offen war.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie und besonders den Mitarbeitern der Papillomvirusarbeitsgruppe für das gute Arbeitsklima und die Unterstützung bei allen Aspekten der Arbeit. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei meiner „Mitstreiterin“ Evamaria Huber, die jederzeit für all die Fragen offen war, die man sonst niemanden stellen wollte, und die auch für die schwereren Stunden vollstes Verständnis aufbrachte.

Meinen Eltern danke ich für die seelisch-moralische und auch fachliche Unterstützung und meinem kleinen Bruder Ingo dafür, dass er mir jetzt doch den Vortritt im Beenden der Doktorarbeit lässt.

Ein großes Dankeschön auch an all diejenigen, die dazu beigetragen haben, dass ich eine schöne Zeit in Tübingen verlebt habe. Besonders an meine Mitbewohner Alois und Elke, die mich immer wieder daran erinnern haben, dass es noch eine wesentliche Welt außerhalb des Labors gibt, und an Frauke, deren Energie fast jeden mitreißt. Dem mikrobiologischem- und geringgradig virologischem Institutsfußballteam und dem Mapet-Fitnessclub danke ich dafür, dass die Nervennahrung Schokolade doch nicht zu deutlich überhand genommen hat. Vielen Dank auch an alle Freunde in Resteuropa, die man leider viel zu selten sieht, die mich aber immer wieder telefonisch und via e-mail aufgemuntert haben.